



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**COMPARAÇÃO DA ABERTURA DOS TÚBULOS DENTINÁRIOS
DE UM PARTICULADO DE DENTINA HUMANA
MINERALIZADA E PARCIALMENTE DESMINERALIZADA
COM RECURSO A MICROSCOPIA ELECTRÓNICA – ESTUDO
PILOTO EXPERIMENTAL “*IN VITRO*”**

Trabalho submetido por
João Carlos Tavares Abrantes Trindade
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

setembro de 2019



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**COMPARAÇÃO DA ABERTURA DOS TÚBULOS DENTINÁRIOS
DE UM PARTICULADO DE DENTINA HUMANA
MINERALIZADA E PARCIALMENTE DESMINERALIZADA
COM RECURSO A MICROSCOPIA ELECTRÓNICA – ESTUDO
PILOTO EXPERIMENTAL “*IN VITRO*”**

Trabalho submetido por
João Carlos Tavares Abrantes Trindade
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Mestre Alexandre Miguel Pereira Oliveira Santos

e coorientado por
Prof. Doutor António Alves de Matos

setembro de 2019

“O conhecimento só ganha valor quando compartilhado”

Marcos Lenine

Agradecimentos

Ao meu orientador, Mestre Alexandre Santos, por ter tido a oportunidade de o ter como Professor e Mentor, além de me ter ajudado na realização deste trabalho de investigação.

Ao meu coorientador, Prof. Doutor António Alves de Matos, pela paciência, empenho e ajuda na parte das observações microscópicas.

Ao Prof. Doutor Luís Proença, pela ajuda no tratamento dos dados estatísticos deste trabalho de investigação.

Aos meus pais, por toda a sua ajuda incondicional e apoio que foi dado durante todo o meu percurso e toda a minha vida!

Aos meus irmãos, que sempre estiveram presentes mesmo quando distantes!

À minha namorada, a minha melhor amiga e companheira de todas as horas, que sempre esteve lá para mim. Esta vitória também é tua!

À minha avó, que fez das minhas prioridades as suas prioridades!

Aos meus verdadeiros amigos que sempre apoiaram e acreditaram no meu futuro.

Resumo

Objetivo: Este trabalho de investigação é um estudo piloto experimental “*in vitro*” onde será avaliado e comparado qual o impacto do protocolo do processamento de matriz de dentina autógena mineralizada e parcialmente desmineralizada relativamente à abertura dos túbulos dentinários. Será feita uma avaliação e respetiva comparação, com recurso a microscopia eletrónica de uma amostra de dentes íntegros sujeitos a estes dois tipos de procedimento.

Materiais e métodos: Foram processados e triturados 60 dentes íntegros por meio da máquina “Smart Dentin GrinderTM”, estabelecendo-se três grupos de estudo consoante o processamento aplicado (Grupo A-controlo, $n=20$ dentes; Grupo B-dentina mineralizada, $n=20$ dentes; Grupo C-dentina parcialmente desmineralizada, $n=20$ dentes). Todas as amostras foram observadas ao microscópio eletrónico de varrimento (SEM), com ampliação de 1000x com 20Kv e com uma distância de trabalho de 13mm. O diâmetro dos túbulos foi medido individualmente com recurso ao programa informático “ImageJ”, dando um total de 3000 túbulos dentinários avaliados. Os resultados foram tratados estatisticamente com o programa “SPSS” de forma a avaliar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre o diâmetro dos túbulos dentinários consoante o processamento aplicado.

Resultados: Foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p<0,001$) entre o Grupo A ($1,401\pm0,285$), o Grupo B ($2,123\pm0,303$) e o Grupo C ($3,323\pm0,415$), relativamente à abertura dos túbulos dentinários, consoante o processamento aplicado.

Conclusão: Esta investigação permitiu aferir qual a influência do protocolo de processamento, de um particulado de dentina autógena humana, no diz respeito à abertura dos túbulos dentinários. Foi demonstrado, com diferenças estatisticamente significativas ($p<0,001$), que o protocolo de processamento da dentina parcialmente desmineralizada permite a maior abertura dos túbulos dentinários, sendo suportada a hipótese em estudo.

Palavras-Chave: Enxerto de dentina autógena, Matriz de dentina autógena, Enxerto de dente autógeno, Dentina Mineralizada, Dentina Parcialmente Desmineralizada, Smart Dentin Grinder, SEM, Regeneração óssea

Abstract

Objectives: This research work is an in vitro experimental pilot study where it will be evaluated and compared what is the impact of the mineralized and partially demineralized autogenous dentin matrix processing protocol regarding the opening of the dentinal tubules. An evaluation and comparison will be made using electron microscopy of a sample of healthy teeth subjected to these two types of procedure.

Materials and Methods: 60 teeth were processed and ground using the Smart Dentin Grinder™ machine, establishing 3 study groups according to the applied processing (Group A-control, $n=20$ teeth; Group B-mineralized dentin, $n=20$ teeth; Group C dentin partially demineralized, $n=20$ teeth). All samples were observed under a scanning electron microscope (SEM) with a magnification of 1000x with 20Kv and a working distance of 13mm. The diameter of the tubules was individually measured using the software program “ImageJ”, giving a total of 3000 evaluated dentinal tubules. The results were statistically treated with the “SPSS” program in order to evaluate the existence of statistically significant differences between dentinal tubule diameter according to the applied processing.

Results: Statistically significant differences ($p < 0.001$) were observed between Group A (1.401 ± 0.285), Group B (2.123 ± 0.303) and Group C (3.323 ± 0.415) regarding the opening of the dentinal tubules, depending on the processing applied.

Conclusion: This investigation allowed us to determine the influence of the processing protocol of a human autogenous dentin particle on the opening of dentinal tubules. It has been demonstrated, with statistically significant differences ($p < 0.001$), that the partially demineralized dentin processing protocol allows the largest opening of the dentinal tubules, supporting the hypothesis under study.

Key words: Autogenous dentin graft, Autogenous dentin matrix, Autogenous graft, Mineralized dentin, Partially demineralized Dentin, Smart Dentin Grinder, SEM, Bone Regeneration

Índice Geral

I.	INTRODUÇÃO.....	13
1.	EXTRAÇÃO DENTÁRIA.....	13
2.	ENXERTOS ÓSSEOS	14
2.1	<i>Autoenxertos.....</i>	<i>16</i>
2.2	<i>Aloenxertos.....</i>	<i>16</i>
2.3	<i>Xenoenxertos.....</i>	<i>16</i>
2.4	<i>Material Alopástico.....</i>	<i>17</i>
3.	DENTINA.....	18
3.1	<i>Dentinogénese.....</i>	<i>19</i>
3.2	<i>Matriz orgânica da dentina.....</i>	<i>22</i>
3.3	<i>Semelhanças da dentina com o osso alveolar.....</i>	<i>31</i>
3.4	<i>Matriz de dentina autógena para enxerto.....</i>	<i>32</i>
3.5	<i>Métodos de processamento da matriz de dentina.....</i>	<i>34</i>
4.	EVIDÊNCIA CIENTÍFICA.....	43
II.	OBJECTIVOS E HIPÓTESES.....	53
1.	OBJECTIVOS DO ESTUDO.....	53
2.	HIPOTÉSES DO ESTUDO.....	53
III.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
1.	TIPO DE ESTUDO.....	55
2.	LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO.....	55
3.	AMOSTRA.....	55
4.	MATERIAIS.....	55
5.	GRUPOS DE ESTUDO.....	56
6.	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	56
IV.	RESULTADOS.....	63
V.	DISCUSSÃO.....	71
VI.	CONCLUSÃO.....	75
VII.	PERSPETIVAS FUTURAS.....	77
	BIBLIOGRAFIA.....	79

Índice de figuras

Figura 1: Preparação do dente com broca de tungsténio para o processamento

Figura 2: Dente dentro da câmara da máquina “Smart Dentin Grinder™”

Figura 3: Seleção das definições adequadas no painel para a trituração do dente

Figura 4: Particulado de enxerto de dentina autógena humana, obtido após trituração. (Compartimento superior e inferior respetivamente)

Figura 5: Particulado de dentina autógena humana com as dimensões pretendidas situadas entre 300 e 1200µm

Figura 6: Particulado de dentina autógena humana distribuído pelos respetivos grupos de estudo

Figura 7: Soluções aplicadas ao particulado de dentina, “cleanser”, EDTA e PBS respetivamente

Figura 8: Amostras de particulado antes e depois do recobrimento com paládio respetivamente

Figura 9: Máquina de evaporação a vácuo JEE-400

Figura 10: Microscópio eletrónico de varrimento (SEM) – JSM-5400

Figura 11: Determinação do diâmetro dos túbulos dentinários através do programa “ImageJ”

Figura 12: Uma das partículas de dentina do **Grupo A**, observada ao SEM (1000x)

Figura 13: Uma das partículas de dentina do **Grupo B**, observada ao SEM (1000x)

Figura 14: Uma das partículas do **Grupo C**, observada ao SEM (1000x)

Figura 15: Medição da escala da imagem para calibração da régua digital com o programa informático “ImageJ”

Figura 16: Medição do diâmetro dos túbulos dentinários de uma partícula de dentina com o programa informático “ImageJ”

Figura 17: Critério de medição dos túbulos dentinários de uma partícula de dentina com o programa informático “ImageJ”

Índice de tabelas

Tabela 1: Características ideais de enxerto ósseo (Adaptado de Tang et al., 2016)

Tabela 2: Propriedades dos vários tipos de enxerto consoante a sua origem (Adaptado de Tang et al., 2016)

Tabela 3: Constituintes da matriz orgânica da dentina (Adaptado de Goldberg et al., 2012)

Tabela 4: Proteínas não colagénicas da matriz orgânica da dentina (NCP's) (Adaptado de Orsini et al., 2012)

Tabela 5: Fatores de crescimento da matriz orgânica da dentina (Adaptado de Smith et al., 2015; Orsini et al., 2012)

Tabela 6: Protocolo de processamento de matriz de dentina autógena mineralizada (Adaptado de Protocolo da Kometabio para processamento de matriz de dentina autógena mineralizada)

Tabela 7: Protocolo de processamento de matriz de dentina autógena parcialmente desmineralizada (Adaptado de Protocolo da Kometabio para processamento de matriz de dentina autógena parcialmente desmineralizada)

Tabela 8: Utilização da matriz de dentina como enxerto autógeno (Khanijou et al., 2018; Tabatabei et al., 2016)

Tabela 9: Grupos de estudo

Tabela 10: Grupos de estudo

Tabela 11: Estatística descritiva do diâmetro dos túbulos dentinários consoante o grupo

Tabela 12: Boxplot representativo do diâmetro dos túbulos dentinários dos grupos de estudo

Tabela 13: Estatística descritiva do diâmetro dos túbulos dentinários consoante o grupo segundo teste One-way ANOVA

Tabela 14: Estatística descritiva do diâmetro dos túbulos dentinários consoante o grupo segundo o teste de Tuckey

Tabela 15: Gráfico de barras de médias dos grupos de estudo

• • •

Índice de abreviaturas

ABTB – Bloco de matriz de matriz desmineralizada

ADM – Adrenomedulina

ADDM – Matriz de dentina autógena desmineralizada

APDDM – Matriz de dentina autógena parcialmente desmineralizada

ATG – Enxerto de dente autógeno

BGP – Proteína-Gla óssea

BMP – Proteína morfogénica óssea

BSP – Sialoproteína óssea

DDM – Matriz de dentina desmineralizada

DGP – Glicoproteína dentinária

DMP – Proteína da matriz dentinária

DMP 1 – Proteína da matriz dentinária 1

DPP – Fosfoproteína dentinária

DSP – Sialoproteína dentinária

DSPP – Sialofosfoproteína dentinária

ECM – Matriz orgânica extracelular da dentina

EDS – Espectroscopia de raio x por dispersão em energia

EDTA – Ácido Etilenodiamino tetracético

EGF – Fator de crescimento epidérmico

FDDB – enxerto alógeno de osso liofilizado

FGF-2 – Fator de crescimento de fibroblastos 2

Gla – Acido glutâmico

IGF-I – Fator de crescimento insulina-like I

IGF-II – Fator de crescimento insulina-like II

IgG – Imunoglobulina G

ISQ – Coeficiente de estabilidade implantar

JAD – Junção amelo-dentinária

LAP – Propeptídeo associado à latência

LTBP – Proteína latente de ligação

MEPE – Fosfoglicoproteína da matriz extracelular

MGP – Proteína da matriz-Gla

MMP – Metaloproteínas

MMP 2 – Gelatinase A
MMP 8 – Colagenase-2
MMP 9 – Gelatinase B
MMP 20 – Esmaltina
MTA – Agregado de trióxido mineral
NaOH – Hidróxido de sódio
NCP – Proteína não-colagénica
OCN – Osteocalcina
OF45 - Osteoregulina
OPN – Osteopontina
PBS – Solução salina fosfatada tampão
PDGF – Fator de crescimento derivado das plaquetas
PG – Proteoglicanos
PIGF – Fator de crescimento derivado da placenta
PTFE - Politetrafluoretileno
PTH – Hormona paratiroideia
SDG –Smart Dentin Grinder™
SEM – Scanning Electron Microscope (Microscópio Eletrónico de Varrimento)
SLRP – Família de pequenos proteoglicanos ricos em leucina
SPARC - Osteonectina
TC – Tomografia Computorizada
TCP – Fosfato tricálcico
TGF- β - Fator de crescimento transformante β
TGF- β 1 – Fator de crescimento transformante β 1
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

I. Introdução

1. Extração Dentária

A extração dentária é um dos procedimentos mais comuns em Medicina Dentária. É aplicada como tratamento para dentes não restauráveis, severamente desalinhados, supranumerários, afetados por doença periodontal avançada, por lesões periapicais e periodontais (Khanijou et al., 2018).

As causas mais comuns de extração dentária são a doença periodontal, a cárie, a fratura radicular (Minamizato et al., 2017).

Está bem documentado que a extração dentária induz a médio e longo prazo, mudanças significativas na crista óssea (Araújo & Lindhe, 2009; Binderman et al., 2014).

A ausência do dente despoleta uma série de eventos que conduzem a alterações anatómicas locais irreversíveis, tanto em altura como em largura ao nível da crista do osso alveolar (Araújo & Lindhe, 2009; Kim et al., 2015)

Foi demonstrado através de diversos estudos que após a extração dentária, o processo alveolar sofre alterações estruturais e dimensionais, causando a atrofia da crista óssea alveolar (Araújo & Lindhe, 2009; Khanijou et al., 2018).

Segundo Kim et al., após a extração, são observadas reduções na largura na ordem dos 2,6 a 4,6 mm e na altura de 0,4 a 3,9 mm (Kim et al., 2015).

Segundo o estudo realizado por Araújo e Lindhe em 2009, após a extração dentária, ocorre uma redução de cerca de 35% nas dimensões do tecido ósseo (Araújo & Lindhe, 2009).

Atualmente o tratamento do edentulismo baseia-se principalmente na reabilitação com implantes dentários. É, pois, fundamental a manutenção e a disponibilidade óssea adequada, para que a reabilitação implanto-suportada seja funcional e estética a longo prazo (Iocca et al., 2017; Milinkovic & Cordaro, 2014).

Na generalidade dos casos os dentes recém extraídos são descartados. Seria benéfico se estes pudessem ser utilizados como material de enxerto autógeno, devido às ótimas características por estes apresentadas possibilitando diminuir possíveis sequelas adicionais para o paciente relacionados com a colheita de enxerto ósseo autógeno (Minamizato et al., 2017).

2. Enxertos Ósseos

A reabilitação oral com recurso a implantes dentários tornou-se uma opção de tratamento altamente previsível. Consequentemente, isto tem levado à procura e interesse crescente pelas técnicas de preservação e aumento do osso alveolar (Minamizato et al., 2017; Koga et al., 2016).

Hoje em dia existem diversas opções disponíveis de materiais de enxerto ósseo, o seu uso, será ditado pelas suas propriedades físico-químicas, o tipo de defeito ósseo e o objetivo principal do procedimento, de forma a melhorar os resultados clínicos (Calvo-Guirado et al., 2018).

Um enxerto ósseo é um material que visa a regeneração e formação óssea. Os materiais de enxerto podem ser classificados como osteogénicos (habilidade de produzir novo osso através da diferenciação de células progenitoras em osteoblastos presentes no osso recetor), osteoindutores (indução da diferenciação de células estaminais mesenquimatosas em novas células produtoras de osso) e osteocondutores (propriedade que permite ao enxerto atuar como uma matriz que suportará a formação de novo osso e novos vasos sanguíneos) (Oryan et al., 2015; Kim et al., 2014; Tang et al., 2016). Na tabela 2 estão representados os vários tipos de enxerto ósseo consoante a sua origem e suas características (Adaptado de Tang et al., 2016)

Os enxertos podem ser ainda classificados como autólogo (do indivíduo em questão), aloenxertos (de indivíduos da mesma espécie, mas geneticamente diferentes), xenoenxertos (derivado de origem animal) e material aloplástico (sintético) (Kim et al., 2015)

O material ideal de enxerto ósseo deve estabilizar o coágulo sanguíneo que permanece no alvéolo, fornecer um suporte biomecânico para a migração celular, proliferação e diferenciação celular. Este, deve ainda conter proteínas funcionais, tais como fatores de crescimento, e exibir um bom equilíbrio entre reabsorção e remodelação óssea (Kim et al., 2015).

Outra característica importante é a rugosidade e porosidade externa do material. As superfícies das partículas do material irão influenciar diretamente a fixação de solventes à superfície do biomaterial, permitindo a colonização celular, o que conduz ao processo de remodelação do biomaterial (Calvo-Guirado et al., 2018).

A presença de poros, nas partículas do biomaterial de enxerto, tem-se mostrado um critério deveras importante, permitindo que ocorra a formação de novos vasos

sanguíneos (angiogénese), o que favorece o crescimento e formação óssea. O grau de porosidade e a sua disposição, influencia diretamente o comportamento biológico dos materiais de enxerto ósseo (Calvo-Guirado et al., 2018).

Nesse contexto, foi dada preferência a duas características, o tamanho da partícula e a composição química do biomaterial, estando estas diretamente relacionadas com a atividade e velocidade de reabsorção do biomaterial (Calvo-Guirado et al., 2018).

Um biomaterial de enxerto ósseo deve ter um comportamento “bimodal”, ou seja, permitir que nas fases iniciais de diferenciação os osteoblastos, construam ligações entre as partículas e que interajam com outros osteoblastos, levando à proliferação e diferenciação celular (Calvo-Guirado et al., 2018).

São também características ideais de enxerto, segundo Tang et al., 2016, a biocompatibilidade, a taxa de reabsorção, a semelhança mecânica com o osso alveolar, a dimensão dos poros e porosidade. Na tabela 1 podemos observar as características ideais de um enxerto ósseo (Tang et al., 2016).

Biocompatibilidade	A capacidade de um material despoletar atividades celulares normais, sem resultar em toxicidade. O material de enxerto ideal é osteocondutor, osteoindutor e osteogênico. Além de que o mesmo deve promover a angiogénese, permitindo a formação de novos vasos sanguíneos.
Taxa de reabsorção	A reabsorção de um material, deve ser feita de uma forma lenta de modo a criar espaço para o crescimento de novo tecido ósseo.
Semelhança mecânica com o osso alveolar	O material de enxerto ósseo ideal deve corresponder às propriedades do osso hospedeiro, de forma a lidar com a transferência de carga e a suportar o stress mecânico.
Dimensão dos poros e porosidade	Propriedade crítica para a difusão de nutrientes e oxigênio para ser obtida sobrevivência e proliferação celular. Foi demonstrado que é necessária uma dimensão mínima de 100µm, apesar de que 200 a 350µm compreende o tamanho ideal para a formação de tecido ósseo. Porém o aumento da porosidade resulta na redução da resistência mecânica do material.

Tabela 1: Características ideais de enxerto ósseo (Adaptado de Tang et al., 2016)

2.1 Autoenxertos

Os enxertos ósseos autógenos são amplamente utilizados e são considerados o "gold-standard" para a regeneração óssea devido às características osteogénicas, osteoindutivas e osteocondutoras que o mesmo exhibe. Os autoenxertos não desencadeiam respostas imunológicas nem patológicas, no entanto a disponibilidade limitada, a possibilidade de origem de defeitos, morbilidade e complicações locais para o doente são consideradas limitações deste tipo de enxerto (Calvo-Guirado et al., 2017; Minamizato et al., 2017; Kim et al., 2014; Lee et al., 2014).

De forma a ultrapassar as desvantagens dos enxertos autógenos e ter simultaneamente bons resultados, em termos de regeneração, tem sido explorado o potencial do enxerto de matriz de dentina autógena humana (Khanijou et al., 2018; Koga et al., 2016).

Por outro lado, a utilização do osso autógeno não está sujeita a considerações éticas, quando comparado com o uso de aloenxertos e xenoenxertos (Calvo-Guirado et al., 2018).

2.2 Aloenxertos

Os aloenxertos são provenientes de osso humano, geralmente de ossos longos colhidos de cadáveres, ou seja, o dador e o recetor são geneticamente diferentes embora sejam da mesma espécie. Os aloenxertos possuem uma taxa de reabsorção rápida, portanto, não fornecem a função de suporte necessária para a remodelação óssea a longo prazo. No entanto, integram-se muito bem com o osso recém-formado devido à sua capacidade osteocondutora, além de que estimulam a formação óssea por serem altamente osteoindutivos (Calvo-Guirado et al., 2017; Kim et al., 2014). No entanto é sabido que os aloenxertos carregam o risco de transmissão de doenças infecciosas, além de serem altamente dispendiosos (Koga et al., 2016; Khanijou et al., 2018).

2.3 Xenoenxertos

Os xenoenxertos são derivados de origem animal. Estes possuem uma baixa taxa de reabsorção e atuam como um suporte para a formação do novo osso (Tang et al., 2016; Calvo-Guirado et al., 2017).

O osso bovino desproteinizado anorgânico é o xenoenxerto mais utilizado e mais bem estudado. No entanto, os biomateriais de enxerto derivados de origem animal, além de serem altamente dispendiosos, apresentam o risco de transmissão de doenças infecciosas, como a Doença de “Creutzfeldt-Jakob” (Pang et al., 2016; Kim et al., 2014; Kim et al., 2010)

Os tamanhos de partícula deste grupo variam entre 0,25 a 1,00 mm (Kim et al., 2014)

No entanto, o uso deste tipo de biomaterial pode levantar questões éticas e religiosas (Khanijou et al., 2018).

2.4 Material Aloplástico

Os enxertos ósseos sintéticos são relativamente baratos e não possuem risco de transmissão de doenças infecciosas, porém não têm capacidade osteogénica nem osteoindutiva (Oryan et al., 2015; Calvo-Guirado et al., 2017; Kim et al., 2010).

O material aloplástico apenas possui inerente a si propriedades osteocondutoras (Kim et al., 2014; Khanijou et al., 2018).

Entre os vários materiais estudados dentro deste grupo, o fosfato tricálcico (TCP) tem demonstrado os melhores resultados no âmbito da regeneração óssea (Calvo-Guirado et al., 2018).

	Pontos positivos	Pontos negativos
Autoenxerto	Osteogénico Osteocondutivo Osteoindutivo	Morbilidade para o doente Quantidade e disponibilidade limitada
Aloenxerto e Xenoenxerto	Osteocondutivo Osteoindutivo Alta disponibilidade Obtenção sem causar morbilidade local	Ausência de capacidade osteogénica e vascularização Risco de rejeição Risco de transmissão de doenças infecciosas Custo elevado
Substitutos modificados através de	Osteocondutivo	Taxa de reabsorção variável Neovascularização baixa Resposta imune desconhecida

materiais biológicos ou sintéticos		Propriedades mecânicas limitadas
---------------------------------------------------	--	----------------------------------

Tabela 2: Propriedades dos vários tipos de enxerto consoante a sua origem (Adaptado de Tang et al., 2016)

3. Dentina

De forma a combater as limitações dos tipos de enxerto referidos acima, tornou-se inevitável desenvolver um material de enxerto capaz de realizar o processo de regeneração óssea e simultaneamente superar as desvantagens destes (Minamizato et al., 2017).

A dentina tem vindo a ser estudada com o objetivo de ser empregue como material de enxerto para regeneração óssea devido ao facto de apresentar diversas semelhanças com o osso alveolar, o que despertou a atenção para tal possibilidade (Kim et al., 2013). A dentina é um tecido conjuntivo mineralizado que compreende cerca de 85% da estrutura total do dente. É constituída por componentes orgânicos (20%), componentes inorgânicos (70%) e água (10%), dado que a distribuição destes componentes varia de acordo com a zona e o tipo de dentina (Tabatabaei et al., 2016; Minamizato et al., 2017; Tjäderhane et al., 2012)

A dentina tem como função proteger o tecido pulpar de estímulos externos bacterianos e nocivos. Além de que, devido ao seu módulo de elasticidade, fornece suporte ao esmalte de forma a que este resista a forças sem fraturar (Tjäderhane et al., 2012).

O órgão dentinário pode ser dividido em duas partes. Em primeiro lugar a dentina extracelular que consiste numa matriz extracelular orgânica mineralizada, em segundo lugar uma dentina interna celular e funcional, que inclui os odontoblastos e os seus respetivos prolongamentos de *Thomes* (Tjäderhane et al., 2012).

Os odontoblastos são células colunares secretoras ativas do órgão dentinário especializados na função secretora unidirecional e são os responsáveis pela produção de substâncias colagénicas e não colagénicas durante a formação do órgão dentinário (Smith et al., 2012). Nestes são destacáveis duas partes celulares, o corpo celular e os prolongamentos odontoblásticos. Os seus corpos celulares permanecem alinhados ao longo da periferia da polpa dentária e são responsáveis por depositar novas camadas de dentina. Os prolongamentos atravessam a dentina extracelular mineralizada por meio dos

túbulos dentinários. Os túbulos dentinários são observados como extensões citoplasmáticas que envolvem os processos odontoblásticos (Williams et al., 2015).

A matriz orgânica é composta por macromoléculas comuns ao tecido conjuntivo, e componentes específicos dos tecidos mineralizados. (Tabatabaei et al., 2016; Kim et al., 2013). Esta é composta por 90% de colagénio do tipo I e proteínas não colagénicas (NCP's), tais como fatores de crescimento como a proteína morfogénica óssea (BMP), fosfoproteínas, osteocalcina, proteoglicanos, osteonectina e a sialoproteína dentinária (Khanijou et al., 2018). A mesma é sintetizada pelos odontoblastos, aquando da formação do órgão dentinário, e é uma fonte de fatores de crescimento e moléculas bioativas necessárias para os processos de reparação da dentina (Tabatabaei et al., 2016). Já a sua matriz inorgânica, é formada essencialmente por cristais de hidroxiapatite (Smith et al., 2012).

3.1 Dentinogénese

A dentinogénese corresponde ao processo pelo qual a dentina é formada. A dentina é uma estrutura altamente permeável que pode ser sub-dividida em vários tipos de acordo com o local, função e origem de formação. Dado que a sua composição e estrutura irá variar de acordo com as diferentes partes do dente (Tjäderhane et al., 2012).

Esta pode ser então dividida, de acordo com as fases de formação, em dentina do manto, dentina primária, dentina secundária e dentina terciária (Tjäderhane et al., 2012).

A dentina pode ser também dividida em dentina intertubular e peritubular (Tjäderhane et al., 2012).

3.1.1 Dentina do manto

A matriz da dentina do manto é produzida de forma heterogênea por odontoblastos diferenciados. Esta possui um módulo de elasticidade que permite evitar fraturas através da dissipação das forças a que é sujeita (Goldberg et al., 2012; Tjäderhane et al., 2012). Difere dos restantes tipos de dentina, devido ao facto de possuir uma matriz orgânica irregular formada por fibras de *Von Korff* compostas por colagénio do tipo III e tipo I (Tjäderhane et al., 2012)

A sua composição química também difere, pois, a mesma não possui fosfoproteínas. O conteúdo inorgânico da dentina do manto é menor quando comparado

com dentina *circumpulpar*, além do facto de que a dentina do manto é desprovida de túbulos dentinários (Tjäderhane et al., 2012).

3.1.2 Dentina Primária

A dentina primária corresponde à porção principal de dentina secretada pelos odontoblastos durante a formação do dente. A matriz orgânica da dentina primária é sintetizada de forma homogénea por odontoblastos e a matriz de colagénio, do tipo I, é altamente compacta (Tjäderhane et al., 2012).

A dentinogénese primária finda quando os dentes se tornam funcionais e quando a rizogénese termina (Goldberg et al., 2012; Tjäderhane et al., 2012).

3.1.3 Dentina Secundária

Após os contatos entre as cúspides antagonistas serem estabelecidos e o término da dentinogénese primária ocorre a formação da dentina secundária, sendo que esta é continua ao longo da vida do indivíduo (Goldberg et al., 2012).

Esta dentina tem o nome de dentina secundária. A dentina secundária difere da dentina primária na curvatura dos túbulos dentinários, além de que a estrutura tubular é menos regular (Tjäderhane et al., 2012).

3.1.4 Dentina Terciária

A dentina terciária representa uma defesa para o tecido pulpar em resposta a irritação e estímulos externos tais como a atrição, abrasão, erosão, trauma e cárie dentária (Tjäderhane et al., 2012; Cox et al., 1992; Goldberg et al., 2012).

Existem duas formas de dentina terciária, a dentina reacional (produzida por odontoblastos diferenciados originais) e a dentina reparadora (produzida por células semelhantes a odontoblastos recém-diferenciados) (Tjäderhane et al., 2012; Goldberg et al., 2012; Lesot et al., 1993; Magloire et al., 1992).

A dentina reparadora é o resultado da atividade odontoblástica e de células progenitoras da polpa, implicadas na mineralização. Tal estrutura apresenta mais semelhanças com o osso alveolar do que com a dentina (Goldberg et al., 2012).

3.1.5 Dentina Peritubular e Intertubular

A dentina peritubular refere-se ao material formado em torno dos túbulos dentinários. Este tipo de dentina resulta da deposição, ao longo da superfície interna do lúmen dos túbulos, de uma matriz mineral amorfa, pelos odontoblastos após a formação da dentina intertubular (Goldberg et al., 2012; Tjäderhane et al., 2012).

A síntese de dentina peritubular leva à redução progressiva do lúmen dos túbulos dentinários, o que explica as variações de diâmetro consoante a idade (esclerose dentinária) (Goldberg et al., 2012; Tjäderhane et al., 2012).

A dentina intertubular tem um módulo de dureza menor do que a dentina peritubular, dado que a dureza dentinária está inversamente correlacionada com o conteúdo orgânico e a densidade dos túbulos (Tjäderhane et al., 2012; Kinney et al., 1996).

Relativamente ao conteúdo inorgânico, a dentina peritubular possui um conteúdo inorgânico cerca de 40% superior ao da dentina intertubular. A mesma, além de possuir um conteúdo inorgânico superior, possui uma percentagem inferior em colagénio e componentes orgânicos. Já a dentina intertubular é composta por 90% de colagénio do tipo I e componentes orgânicos (Goldberg et al., 2012; Tjäderhane et al., 2012).

A percentagem de dentina intertubular e peritubular é altamente variável de espécie para espécie (Goldberg et al., 2012).

3.1.6 Túbulos dentinários

A presença de túbulos é uma característica inerente ao órgão dentinário que define as suas propriedades mecânicas, a capacidade de resistir a forças oclusais e o seu comportamento na adesão (Williams et al., 2015; Tjäderhane et al., 2012).

O diâmetro dos túbulos dentinários é variável consoante a posição espacial, dado que o mesmo aumenta em direção à polpa. Os ramos principais possuem um diâmetro de 0,5 a 1,0 mm e são abundantes na periferia, enquanto que os ramos finos têm um diâmetro de 300 a 700 nm e estão presentes nas áreas de baixa densidade tubular. Existem ainda os micro-ramos com um diâmetro de 25 a 200 nm (Tjäderhane et al., 2012; Goldberg et al., 2012).

O número de túbulos dentinários também é variável, situando-se entre 18.000 a 21.000 túbulos dentinários por mm². (Goldberg et al., 2012).

Os odontoblastos ao diferenciarem-se, alongam-se e começam a exibir duas partes anatómicas distintas, um corpo celular e um prolongamento que percorre o lúmen dos túbulos dentinários (prolongamentos de *Thomes*) (Goldberg et al., 2012; Tjäderhane et al., 2012).

3.1.7 Modelo de três compartimentos

Fisiologicamente e estruturalmente a dentina é altamente complexa. Sendo assim diferentes dentina são identificáveis: osteodentina, vasodentina e ortodentina (Goldberg et al., 2012; Kawasaki et al., 2007; Takuma et al., 1977).

Estudos filogenéticos afirmam as semelhanças entre a dentina e o osso alveolar. As células osteoblásticas, semelhantes a odontoblastos, estão localizadas dentro dos alvéolos, como se aplica ao caso dos osteócitos envolvidos por osso dentro das *lacunae*. Esta organização estrutural com o nome de osteodentina, é observada durante o desenvolvimento dos dentes em algumas espécies de mamíferos, tais como nos roedores e na dentina reparadora em humanos (Kawasaki et al., 2007; Takuma et al., 1977; Goldberg et al., 2012).

A dentina, ao contrário do osso, é avascular. Porém, em algumas espécies de peixes foi identificado dentina vascularizada denominada de vasodentina (Kerebel et al., 1979; Goldberg et al., 2012).

Quando os odontoblastos se diferenciam, produzem a ortodentina. Esta é marcada pela presença de corpos celulares, localizados na exterior da camada de dentina e pré-dentina, na periferia da polpa cujos processos odontoblásticos (prolongamentos de *Thomes*) atravessam a pré-dentina e se estendem pelos túbulos dentinários até a junção amelo-dentinária (JAD) (Goldberg et al., 2012).

3.2 Matriz orgânica da dentina (ECM)

Cerca de 90% da matriz orgânica da dentina é composta por colagénio, sendo o colagénio do tipo I o mais abundante. Os odontoblastos são os responsáveis pela síntese de colagénio, um homopolímero composto por três cadeias alfa-1 também designadas de trímero do tipo I (Butler & Ritchie, 1995; Sodeck & Mandell, 1982; Tjäderhane et al., 2012).

O colagénio tipo I da matriz, permite formar um modelo dinâmico e instrutivo para a deposição de cristais de fosfato de cálcio para sua transformação posteriormente em cristais de hidroxiapatite. O processo de enucleação de hidroxiapatite e mineralização do colagénio da matriz é altamente regulado pelas proteínas não colagénicas (NCP's) (Ravidran et al., 2015; Tabatabaei et al., 2016).

Os fatores de crescimento presentes na matriz orgânica da dentina incluem tais como as proteínas morfogénicas ósseas (BMPs), o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I e II (IGF-I e II), o fator de crescimento transformante- β . (TGF- β) e fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF). Todos os fatores atrás referidos desempenham um papel importante no processo de formação e remodelação óssea (Smith et al., 2015; Goldberg et al., 2012; Khanijou et al., 2018).

Os outros 10% da matriz orgânica da dentina, são representados por proteoglicanos, proteínas não colagénicas (NCP's) e lípidos (Tabela 3) (Goldberg et al., 2012). As proteínas não colagénicas tais como fosfoproteínas, osteocalcina, proteoglicanos, osteonectina e a sialoproteína dentinária, desempenham papéis biológicos fulcrais na formação e remodelação de osso alveolar e dentina (Tjäderhane et al., 2012; Khanijou et al., 2018). Estas são produzidas pelos odontoblastos e estão situadas entre as fibras de colagénio e as paredes dos túbulos dentinários (Tjäderhane et al., 2012).

A proteínas da matriz orgânica da dentina, têm variadas funções tais como a sinalização intracelular, a diferenciação de células progenitoras, a proliferação celular e a mineralização (Ravidran et al., 2015).

Todos os constituintes da matriz orgânica da dentina acima referidos encontram-se representados na tabela 3 (Goldberg et al., 2012).

Colagénio 90%		Colagénio tipo I (89%)	Colagénio tipo III e tipo V (1-3%)
		Integrinas (SIBLINGS's)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sialofosfoproteína dentinária (DSPP) 2. Sialoproteína dentinária (DSP) 3. Glicoproteína dentinária (DGP) 4. Fosfoproteína dentinária (DPP) 5. Proteína da matriz dentinária-1 (DMP-1) 6. Sialoproteína óssea (BSP)

Proteínas não colagénicas NCP's (10%)	Proteínas fosforiladas não colagénicas		7. Osteopontina (OPN) 8. Fosfoglicoproteína da matriz extra-celular (MEPE)
		Família de pequenos proteoglicanos ricos em leucina (SLRP)	Decorina
		Amelogenina	Formas resultantes de <i>splicing</i> alternativo: 1. A+4 2. A-4
		Outras proteínas do esmalte	Ameloblastina
		Proteolipidos	Fosfolipidos da matriz
Proteínas não colagénicas NCP's (10%)	Proteínas não fosforiladas não colagénicas	Osteocalcina e Proteína-Gla dentinária	1. 5.7kDa inibidora da mineralização 2. 14kDa
		Osteonectina (SPARC)	43kDa
		Proteínas séricas	1. Albumina 2. Glicoproteína Alfa 3. Fetúina
		SLRP's	1. Biglicano 2. Decorina 3. Lumican 4. Fibromedulina 5. Osteoadarina
		Fatores de crescimento	FGF2, TGF beta1, BMP's. IGFI e II, PDGF
		Enzimas	1. Fosfatase alcalina 2. Fosfatase ácida 3. Proteases séricas 4. Colagenases 5. Gelatinases 6. Metaloproteínas
		Poliaminas	1. Espermina 2. Espermidina 3. Putresceína
		Proteínas fixadoras de cálcio	1. Calmudulina 2. Calbindina 3. Anexina 4. Nucleobindina

Tabela 3: Constituintes da matriz orgânica da dentina (Adaptado de Goldberg et al., 2012)

3.2.1 Proteínas não colagénicas da matriz dentinária (NCP's)

As proteínas não colagénicas (NCP's), são moléculas reguladoras bioativas do tipo proteínas fosforiladas que incluem a sialoproteína dentinária (DSP), a fosfoproteína dentinária (DPP), a sialoproteína óssea (BSP), a proteína da matriz dentinária-1 (DMP-1), a osteopontina (SPARC) e a osteoregulina (MEPE), osteocalcina (OCN) e a osteopontina (OPN) (Tabela 4) (Orsini et al., 2012). Este grupo de proteínas, participa ativamente na sinalização celular e atuam como fatores de nucleação e de regulação no processo de mineralização. Estas, estão então diretamente envolvidas nos processos de reabsorção, remodelação e formação de novo osso (Kim et al., 2013; Butler et al., 1977).

Existem diversos grupos dentro das NCP's, mas apenas um grupo contém proteínas específicas para a dentina. Este grupo de proteínas, expresso e sintetizado apenas por odontoblastos, é designado como proteínas específicas da dentina. Inclui a fosfoproteína dentinária (DPP), a sialoproteína dentinária (DSP) e a proteína da matriz dentinária (DMP-1). O outro grupo de NCP's, corresponde às proteínas da matriz extracelular. Estas são encontradas tanto no osso como na dentina e cimento. Este grupo inclui a sialoproteína óssea (BSP), a osteocalcina e a proteína-Gla óssea (BGP). Sendo este grupo reconhecido como proteínas específicas dos tecidos mineralizados. O efeito destas proteínas na proliferação celular, os seus efeitos sinérgicos ou antagónicos com fatores tais de crescimento tais como PDGF e TGF-beta foram já previamente demonstrados (Tabatabaei et al., 2016).

A DSP é uma proteína reguladora da formação e crescimento dos cristais de fosfato de cálcio (Goldberg et al., 2012; Kim et al., 2013). A DPP, incluindo a fosforina, leva à nucleação e inibição da mineralização da dentina intertubular (Goldberg et al., 2012). Tanto a DSP como DPP são sub-produtos resultantes da clivagem da sialofosfoproteína dentinária (DSPP) e são expressas principalmente pelos odontoblastos (Smith et al., 2012; Ritchie et al., 1995).

A BSP está presente na dentina terciária e no tecido ósseo, estando envolvida na formação dos cristais de hidroxiapatite além de também funcionar como um inibidor da formação dos mesmos (Qin et al., 2004; Boskey et al., 2008; Smith et al., 2012).

A proteína da matriz dentinária-1 (DMP-1) promove a diferenciação dos odontoblastos e é essencial para a mineralização e maturação do órgão dentinário (Toyosawa et al., 2004; Smith et al., 2012).

A osteopontina (OPN) está envolvida no processo inflamatório e desencadeia o processo de osteogênese através da diferenciação dos osteoblastos, porém também participa do processo de reabsorção óssea, pois permite a aderência de osteoclastos à superfície óssea (Kim et al., 2013; Goldberg et al., 2012; Smith et al., 2012).

A osteocalcina (OCN) está presente tanto na matriz extracelular óssea como na matriz dentinária, sendo inibidora da atividade da transglutaminase tecidular (Papagerakis et al., 2002; Smith et al., 2012).

Tanto a osteoregulina (MEPE/OF45) como a proteína da matriz-Gla (MGP) funcionam como inibidores da mineralização (Goldberg et al., 2012).

A osteonectina ou proteína secretada ácida e rica em cisteína (SPARC), é uma proteína da membrana basal de ligação ao cálcio e ao colagénio. Pode contribuir indiretamente para a mineralização da dentina (Goldberg et al., 2012).

Os proteoglicanos da matriz dentinária (PGs) desempenham papéis estruturais, metabólicos e funcionais nos tecidos moles e mineralizados, mas também participam no processo de mineralização tanto da dentina como do osso alveolar (Orsini et al., 2012).

Por fim, as metaloproteínases (MMPs) são uma família de enzimas dependentes de Zn^{2+} e Ca^{2+} . Este tipo de enzimas são componentes importantes em muitos processos biológicos e patológicos, devido à sua capacidade de degradação da matriz orgânica da dentina (Mazzoni et al., 2012).

Proteoglicanos (PG's)	<p>Família de pequenos proteoglicanos ricos em leucina (SLRP)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Decorina 2. Biglicano 3. Fibromedulina 4. Lumican 5. Osteoadarina <p>Proteoglicanos de alta agregação</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Versican
Glicoproteínas	<ol style="list-style-type: none"> 1. Osteocalcina (OCN) 2. Fosfoproteínas séricas cálcio-ligantes (SCPP) 3. Osteonectina (SPARC) 4. Osteopontina (OPN) 5. Proteína da matriz dentinária 1 (DMP1) 6. Sialoproteína óssea 7. Sialofosfoproteína dentinária 8. Fosfoglicoproteína da matriz extracelular
Proteínas séricas	<ol style="list-style-type: none"> 1. Albumina 2. IgG 3. Transferina 4. Fetuina-A
Enzimas	<p>Metaloproteinases e catepsinas</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Colagenase-2 (MMP-8) 2. Gelatinase A (MMP-2) 3. Gelatinase B (MMP-9) 4. Esmaltelina (MMP-20) 5. Catepsina B
Fatores de crescimento	<ol style="list-style-type: none"> 1. Fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) 2. Fator de crescimento esquelético/ Fator de crescimento semelhante à insulina II (SGF/IGF-II) 3. Fator de crescimento transformante beta 1 (TGF-beta1) 4. Fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) 5. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) 6. Fator de crescimento da placenta (PIGF) 7. Fator de crescimento fibroblástico-2 (FGF-2) 8. Fator de crescimento epidérmico (EGF) 9. Adrenomodulina

Tabela 4: Proteínas não colagénicas da matriz orgânica da dentina (NCP's) (Adaptado de Orsini et al., 2012)

3.2.2 Fatores de crescimento da matriz orgânica da dentina

A matriz orgânica da dentina é constituída por inúmeros de fatores de crescimento. Estes incluem as proteínas morfogénicas ósseas (BMPs), o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I e II (IGF- I e II), o fator crescimento transformante- β (TGF- β), o fator de crescimento fibroblástico (FGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento epidérmico (EGF) entre outros (Gomes et al., 2006). Os fatores de crescimento, são proteínas envolvidas na sinalização celular que regulam o crescimento, proliferação e diferenciação celular, além de que os mesmos ao ligarem-se a glicoproteínas, como a fibronectina, influenciam a adesão celular (Smith et al., 2012; Kim et al., 2013). Todos estes desempenham um papel importante no processo de formação e remodelação óssea (Khanijou et al., 2018). Os fatores de crescimento demonstraram estimular o processo de mineralização e regeneração “*in vitro*” e “*in vivo*”. Além disto, alguns destes possuem propriedades anti-inflamatórias tais como o TGF- β), e a adrenomedulina (ADM) (Smith et al., 2012; Chung et al., 2011; de Gorter et al., 2011)

O fluido dentinário, é então um reservatório de inúmeras enzimas e fatores de crescimento (Khanijou et al., 2018).

Diversos autores afirmam que a proliferação celular é iniciada por fatores estimulantes locais, nomeadamente por meio da proteína morfogenética óssea (BMP) (Gomes et al., 2006). A BMP é uma proteína quimiotática que promove a diferenciação de pré-condroblastos e de pré-osteoblastos. Através da ação da BMP, a diferenciação para condroblastos e osteoblastos permite a formação de novo osso por aposição (Kim, 2014; Kim et al., 2013). A BMP derivada da dentina difere da BMP derivada do osso alveolar na sua origem, porém o modo de ação de ambas é similar. As proteínas morfogénicas ósseas (BMPs) também possuem propriedades osteocondutoras, por servirem como suporte para a formação do novo osso (Khanijou et al., 2018). Dos vários tipos de BMP, a BMP-2 é a que possui mais capacidade osteoindutiva, influenciando esta tanto a diferenciação quanto a proliferação de osteoblastos (Kim, 2014). A presença da BMP na matriz dentinária foi confirmada pela primeira vez em 1965 por Urist. A BMP além de estar presente na matriz dentinária existe também na matriz óssea e no tecido de osteosarcoma (Urist, 1965; Bessho et al., 1990).

Outro fator de crescimento de alta importância no processo de formação e remodelação óssea, é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Este é o fator

pró-angiogénico mais importante no processo de angiogénese, pois participa diretamente na regulação da permeabilidade vascular do processo inflamatório. Esta proteína é 50.000 vezes mais eficiente do que a histamina no que diz respeito ao aumento da permeabilidade vascular (Reis-Filho et al., 2011). Durante o processo de cicatrização óssea, a angiogénese é elementar, dado que a formação de novo osso está intimamente dependente do aporte de nutrientes por parte dos vasos recém-formados e de vasos pré-existent (Reis-Filho et al., 2011).

Na tabela 5 podemos ver os fatores de crescimento presentes na matriz orgânica da dentina e as suas respetivas funções (Smith et al., 2015; Orsini et al., 2012).

Fatores de crescimento	Função
TGF-beta 1	Participa na proliferação celular das células do ligamento periodontal; estimula adesão celular e quimiotaxia; participa na mineralização dentinária e regula o <i>turn-over</i> do complexo pulpo-dentinário
PDGF	Agente angiogénico que intervém no processo de proliferação e quimiotaxia das células do ligamento periodontal; participa no processo de diferenciação odontoblástica
BMP	Estimula a diferenciação osteoblástica e cimentoblástica; participa diretamente na quimiotaxia, proliferação e adesão celular
IGF-I	Estimula a proliferação das células do complexo pulpar
SGF/IGF-II	Potente indutor da formação de osteodentina
VEGF	Estimula a proliferação das células endoteliais
PIGF	Agente angiogénico potenciador do VEGF e regulador da vascularização pulpar
FGF-2	Agente angiogénico
EGF	Agente angiogénico
ADM	O aumento da sua concentração é concomitante com a presença de cárie dentária

Tabela 5: Fatores de crescimento da matriz orgânica da dentina (Adaptado de Smith et al., 2015; Orsini et al., 2012)

3.2.3 Ligação, imobilização e libertação de moléculas bioativas da matriz orgânica da dentina

A matriz orgânica da dentina desempenha um papel fulcral no desenvolvimento tecidular, na homeostase e reparação, através de interações entre células e moléculas. No processo de sinalização, estão incluídos componentes intrínsecos da ECM, enzimas e fatores de crescimento ligados à matriz (Smith et al., 2012).

A natureza bioativa da ECM permite a regulação da atividade celular, incluindo os processos de adesão e migração celular. A ligação dos fatores de crescimento, à matriz orgânica, é necessária para a bioatividade dos mesmos na resposta celular. Posto isto, a dentina atua como um reservatório para moléculas bioativas e fatores de crescimento (Kawada et al., 2009; Smith et al., 2012; Kassolis et al., 2000).

Os componentes da ECM possuem locais de ligação para proteínas, permitindo assim a incorporação destes na matriz extracelular. Um grupo importante dessas moléculas da ECM são os proteoglicanos de *heparan* sulfato. Estes representam um grupo de compostos extracelulares capazes de se ligarem a uma vasta gama de proteínas. O biglicano e a decorina são os principais proteoglicanos encontrados na matriz óssea e dentinária (Smith et al., 2012).

Os fatores de crescimento são sintetizados na forma de uma proteína precursora inativa, ou então ligados a uma proteína de ligação específica, o que lhes confere capacidade de ligação à matriz (Smith et al., 2012; Binderman et al., 2014).

Por exemplo, o TGF-beta é secretado pelas células na forma de um complexo latente inativo com um fator de crescimento dimérico e um propeptídeo associado à latência (LAP), que tem capacidade de realizar ligações covalentes a uma proteína latente de ligação (LTBP). O LTBP é capaz de se ligar a uma variedade de moléculas da matriz orgânica o que resulta na imobilização destes à ECM (Smith et al., 2012; Li et al., 2005).

Logo, as moléculas bioativas da matriz ficam imobilizadas dentro da matriz por fossilização protegidas dos estímulos e interações externas com outras moléculas até serem libertadas por degradação da ECM (Smith et al., 2012).

Os complexos ligados à ECM estão na forma inativa e, podem ser libertados e ativados, através de desmineralização, degradação, remodelação, proteólise e acidificação da matriz (Smith et al., 2012; Lin & Hankenson, 2011; Heldin et al., 1998).

Os agentes quelantes, são capazes de degradar a matriz, através do processo de desmineralização, o que permite a libertação destas moléculas aprisionadas na matriz, tais como fatores de crescimento e NCP's. O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), tem-se mostrado ser o mais eficaz nesse aspeto (Tabatabaei et al., 2016; Smith et al., 2012).

Uma vez que a dentina sofra degradação da sua matriz pelo processo de desmineralização, ocorre um aumento de calibre dos túbulos dentinários, favorecendo dessa forma isto a libertação de proteínas e dos fatores de crescimento (Minamizato et al., 2017).

3.3 Semelhanças da dentina com o osso alveolar

Sabe-se que a estrutura e a composição da dentina detêm uma alta semelhança com o osso alveolar, sendo constituída por material orgânico (20%), material inorgânico (70%) e água (10%), já o osso é constituído por 25%, 65% e 10% respetivamente (Calvo-Guirado et al., 2018; Minamizato et al., 2017; Koga et al., 2016; Kim et al., 2010; Lee et al., 2014).

Relativamente à estrutura, o osso possui um sistema de *Harvers* composto por numerosos canais, enquanto a dentina é uma estrutura composta por uma complexa rede de túbulos dentinários. Existe pois semelhança destes na sua arquitetura estrutural (Khanijou et al., 2018; Smith et al., 2012).

Relativamente à composição orgânica é de destacar as proteínas comuns ao osso e dentina, tal como a osteopontina (OPN), a osteocalcina (OC), a sialoproteína óssea (BSP), o osterix, o colagénio do tipo I e a Cbfa1 (Runx2). A proteína morfogénica óssea (BMP) derivada da dentina, apesar de derivar de entidades distintas, possui um modo de ação semelhante à BMP derivada do tecido ósseo (Khanijou et al., 2018).

É também de salientar a presença de vitamina D e da hormona paratiroideia (PTH), reguladores da aposição e homeostase, no osso e dentina, além da presença de fatores de crescimento comuns entre a dentina e tecido ósseo (Smith et al., 2012).

Além da estrutura e composição, as duas entidades, dentina e osso alveolar, também partilham origem histológica. Os dentes, cartilagens, ossos da face e do crânio desenvolvem-se a partir das células da crista neural, portanto é de esperar que as proteínas e constituintes orgânicos sejam comuns entre osso alveolar, dentina e cimento. (Yoshida et al., 2008; Stevens et al., 2008; Arthur et al., 2008; Binderman et al., 2014; Kim et al., 2013).

Porém, o dente em comparação com o osso, tem um teor em gordura muito menor além de não conter medula. O alto nível de colagénio reticulado no tecido ósseo e a ausência de colagénio do tipo III são também diferenças entre dentina e osso alveolar. (Tjäderhane et al., 2012; Schlueter et al., 1964; Kim et al., 2015).

Logo, de acordo com todas as informações acima referidas, é natural que a dentina, que compreende mais de 85% da estrutura do dente, possa ser uma opção viável que atrai cada vez mais atenção como material de enxerto autógeno para regeneração óssea (Binderman et al., 2014; Koga et al., 2016; Kim et al., 2015).

3.4 Matriz de dentina autógena para enxerto

A dentina tem atraído muita atenção e, portanto, tem sido alvo de diversos estudos devido ao seu potencial uso como biomaterial de enxerto para regeneração óssea, pois além de possuir um conteúdo mineral elevado, quando comparado com os restantes substitutos ósseos, possui uma alta semelhança com o osso alveolar tanto na sua composição como na sua estrutura (Canto-Diaz et al., 2018).

A primeira evidência descrita do potencial regenerativo da matriz de dentina autógena desmineralizada (DDM) data de 1967 por parte de Yeomans e Urist, num estudo animal, onde foi demonstrado a capacidade osteoindutiva desta (Khanijou et al., 2018). De acordo com estes autores, as BMPs, presentes na matriz de dentina e no osso, conferem as propriedades osteoindutivas a este tipo de enxerto (Khanijou et al., 2018).

O primeiro caso clínico documentado, em humanos, remonta a 2003 por parte de Murata, M. que utilizou a matriz de dentina autógena desmineralizada com o objetivo de realizar elevação do seio maxilar (Khanijou et al., 2018).

Acredita-se que a dentina tenha uma alta osteocondutividade, pois é um tecido altamente mineralizado composto por hidroxiapatite. Além disso, espera-se também que a matriz de dentina apresente alta osteoindutividade, pois contém proteínas morfogénicas ósseas (BMPs) e diversos fatores de crescimento (Minamizato et al., 2017; Koga et al., 2016; Kim et al., 2014).

A osteocondutividade e a osteoindutividade, foi demonstrada por Canto-Diaz et al., em 2018 através de um estudo piloto onde testou eficácia do uso de enxerto de dentina autógena. Este estudo piloto demonstrou que, devido à formação de novo osso ao redor do enxerto, é dedutível que a dentina apresente propriedades osteocondutoras e

osteointductoras, dado que os componentes da matriz orgânica da mesma intervêm no processo de formação e remodelação óssea (Canto-Diaz et al., 2018).

Além das suas propriedades, a dentina não possui associado o risco de rejeição imunológica ou de transmissão de doenças infecciosas, uma vez que a matriz de dentina é um tecido autógeno (Calvo-Guirado et al., 2018; Minamizato et al., 2017).

Foi concluído através de análise de microscopia eletrônica que, mesmo após o processo de trituração e desinfecção, os componentes tais como o cálcio e o fósforo são mantidos na matriz de colagénio (Calvo-Guirado et al., 2018).

Adicionalmente, Reis-Filho et al., em 2011, relataram que a matriz de dentina autógena possui propriedades quimiotáticas para com as células osteoprogenitoras. Esta além de ser reabsorvida durante o processo de remodelação óssea, acelera a reparação óssea e a formação de novos vasos por estimulação da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Minamizato et al., 2017; Reis-Filho et al., 2011).

Num estudo realizado por Calvo-Guirado e seus colaboradores, em 2018, foi aferido que é possível obter um volume final de enxerto após o processo de trituração e processamento de cerca 3 vezes maior do que o volume original. Dado que, segundo os mesmos, 0,25gr de dente humano originam 1.0cc de biomaterial de enxerto. Sendo assim Calvo-Guirado et al sugerem que, devido a composição química e volume obtido, o particulado de dentina autógena seja considerado um bom potencial biomaterial para regeneração óssea (Calvo-Guirado et al., 2018).

Também segundo Binderman et al., 2014, o particulado de dentina autógeno, utilizado imediatamente após as extrações, deve ser considerado como o “gold-standard” para o aumento de volume ósseo (Binderman et al., 2014).

Tanto o tipo de processamento, como qual o tamanho ideal de partícula, têm sido os principais alvos de estudo deste tipo de enxerto ao longo do tempo. Dado que, relativamente ao tipo de processamento, de acordo com Koga et al., 2016 a matriz de dentina autógena induz à formação de novo osso, independentemente do tipo de processamento aplicado. Relativamente às dimensões ideais ainda não existe um consenso sobre qual o tamanho ideal a ser utilizado, no entanto diversos autores afirmam que as partículas com dimensões situadas entre 300 a 1200µm promovem a formação de novo osso. Dado que, as partículas de pequenas dimensões, inferiores a 300µm, possuem uma alta taxa de reabsorção e baixa resistência, já as partículas de grandes dimensões, superiores a 1200µm, possuem baixa taxa de reabsorção e alta resistência. O que faz com que partículas fora deste intervalo sejam pouco eficazes (Koga et al., 2016; Calvo-

Guirado et al., 2018; Khanijou et al., 2018; Binderman et al., 2014). Sendo assim, as partículas com dimensões compreendidas entre 800 a 1200µm, possuem resultados superiores no que toca à taxa de reabsorção, taxa de formação de novo osso e resistência (Koga et al., 2016).

No entanto, existem algumas desvantagens inerentes uso desta técnica como a disponibilidade limitada, as indicações limitadas, alguns possíveis problemas que possam estar associados ao seu processamento e quando os defeitos ósseos a serem preenchidos são de grandes dimensões, uma vez que o volume de enxerto é limitado (Minamizato et al., 2017; Khanijou et al., 2018).

3.5 Métodos de processamento da matriz de dentina

É posta então a questão se será necessário que a matriz de dentina sofra algum tipo de processamento previamente ao seu uso como material de enxerto autógeno e qual o melhor tipo de processamento (Tabatabaei et al., 2016).

Existem diversos métodos de processamento da matriz de dentina autógena incluindo a dentina inalterada, tratada com nitrogénio líquido, por eliminação da matriz orgânica, com extração da NCP's, mineralizada, parcialmente desmineralizada e totalmente desmineralizada (Atiya et al., 2014; Tabatabaei et al., 2016).

No entanto, existem escassas informações acerca do processamento adequado da matriz dentina a ser usada como biomaterial de enxerto. Portanto, fica então necessário clarificar qual o grau apropriado de desmineralização e qual o tamanho das partículas conveniente de forma a serem obtidos os melhores resultados na regeneração óssea (Koga et al., 2016).

3.5.1 Utilização de dentina inalterada

Um dente inalterado não pode induzir facilmente a formação de novo osso devido ao seu alto conteúdo inorgânica e baixa porosidade, o que pode interferir na fixação, migração e proliferação celular vascular e mesenquimatosa. Dado que diversos estudos mostraram que o processamento da matriz de dentina autógena melhora as propriedades osteoindutoras da mesma, sendo então este um método pouco utilizado (Tabatabaei et al., 2016).

3.5.2 Processamento da dentina através de extração das NCP's

O método introduzido pela primeira vez por Smith et al., em 1979, é um dos métodos mais antigos de extração das proteínas não colagénicas da matriz de dentina. Esta técnica, consiste em triturar os dentes de forma a ser obtido um particulado, que posteriormente, será tratado com EDTA a 10% durante 10 dias com o objetivo de realizar a degradação da matriz orgânica. Após isto, segue-se a centrifugação e diálise de forma a serem removidas as NCP's da matriz dentinária. Apesar deste método ainda ser usado atualmente, o mesmo tem vindo a sofrer pequenas variações ao longo do tempo (Tabatabaei et al., 2016; Smith & Leaver, 1979).

Atualmente, existem diversos materiais de processamento com vista à extração de NCP's da matriz da dentina tais como, compostos acídicos, hidróxido de cálcio e diferentes tipos de agregados de trióxido mineral (MTA) (Tomson et al., 2007). No entanto diversos estudos apontam o uso de EDTA como o mais eficiente para a degradação da matriz orgânica da dentina (Tabatabaei et al., 2016).

3.5.3 Processamento da dentina por desmineralização ultra-sónica em vácuo

Um dos problemas inerentes ao uso da matriz de dentina totalmente desmineralizada é o tempo inerente ao processamento da mesma. O método convencional de desmineralização, desenvolvido por Kim et al., em 2008, requer cerca de 10 dias de forma a ser concluído. Para colmatar este facto, Lee e colaboradores em 2014, desenvolveram um método mais rápido de desmineralização que utiliza um acelerador ultrassónico a vácuo (VacuaSonicTM; Cosmobio-medicare, Seul, Coréia) (Lee et al., 2014).

Inicialmente todos os tecidos remanescentes são removidos através de uma lâmina e com auxílio de um descolador. Além disto, são executados orifícios com cerca 0,3 mm de diâmetro ao longo de toda a superfície do dente. Após o tratamento inicial o dente é colocado numa solução estéril no interior do sistema ultrassónico a vácuo durante 10 minutos. De seguida são colocados numa solução 0,6 N de HCl por 90 minutos na máquina ultrassônica a vácuo (VacuaSonicTM), e são posteriormente lavados durante 15 minutos em água desionizada ou numa solução salina tamponada com fosfato (PBS). O tempo de processamento é inferior a 2 horas (Lee et al., 2014)

Este método, além de superar as limitações associadas ao tempo de processamento necessário da dentina totalmente desmineralizada, permite prevenir danos térmicos às proteínas da matriz orgânica dentinária (Lee et al., 2014; Kim et al., 2015).

Com o objetivo de testarem a eficácia deste método, Lee e seus colaboradores, realizaram espectroscopia de raio x por dispersão em energia (EDS) com o sistema TEAMTM (Bruker Co., Ewing, NJ, EUA) de forma a determinarem as concentrações minerais de cálcio após o processamento com este método. De acordo com os resultados do estudo a concentração de cálcio na dentina desmineralizada por este método foi de 6,52%, enquanto que no grupo de controlo foi de 31,17% a uma profundidade de 300~600 micrômetros da superfície. O que nos indica que cerca 79% do cálcio presente inicialmente na dentina foi removido (Lee et al., 2014).

3.5.4 Processamento da dentina por eliminação da matriz orgânica

Este tipo de método foi pouco estudado e não é utilizado com frequência. Pois, devido ao peso e à importância das proteínas da matriz dentinária nos processos de migração, adesão, proliferação e diferenciação de celular, a maioria dos investigadores atua de forma a conservar a matriz orgânica da dentina o melhor possível (Tabatabaei et al., 2016). O mesmo consiste em ferver a matriz de dentina em água durante cerca de duas horas e armazenar a mesma em isopropanolol durante o mesmo tempo. Após este procedimento o particulado é seco a 100 C° (Moharamzadeh et al., 2008; Tabatabaei et al., 2016).

3.5.5 Processamento de dentina com nitrogénio líquido

Neste método inicialmente tecidos moles e duros, esmalte e cimento são removidos. A dentina radicular é colocada dentro de um tubo e congelada em nitrogênio líquido durante 15 min a -196° (MVE Vapor Shippers, M02-SC4 / 3V). Após o tratamento com nitrogénio a dentina é então imersa num recipiente estéril preenchido com 0,2 ml de gentamicina e 5 ml de álcool etílico a 70% por cerca de 30 a 60 minutos. Previamente ao enxerto, a dentina é esmagada em pequenas partículas (2 a 4 mm) com auxílio um almofariz e pilão (Atiya et al., 2014).

Atiya e colaboradores, em 2014, realizaram um estudo animal onde o propósito foi avaliar a eficácia do enxerto de dentina processada com nitrogênio líquido. Neste estudo foi comparado a eficácia do enxerto de dentina autógena, tratada com nitrogênio líquido a -196° durante 20 minutos, com o do enxerto ósseo autógeno. Foram incluídos neste estudo 16 coelhos. Os resultados clínicos demonstraram que a matriz de dentina autógena, tratada com nitrogênio líquido, fomentou a regeneração óssea tal como o enxerto ósseo autógeno evidenciando as propriedades osteoindutores e osteocondutoras deste tipo de enxerto (Atiya et al., 2014).

3.5.6 Processamento de dentina mineralizada

De forma a colmatar o facto do processo de desmineralização da matriz de dentina ser muito demorado Binderman et al., em 2014 desenvolveram um novo procedimento, realizável em ambiente clínico, que utiliza os dentes humanos recém extraídos como enxerto autógeno (Binderman et al., 2014).

Inicialmente são removidas dos dentes as restaurações, lesões de cárie, dentina esclerótica, restos de ligamento periodontal e tártaro, com auxílio de uma broca de tungsténio multi-laminada. Sendo de seguida necessário que o dente seja seco com recurso a uma seringa de ar. Após isto os dentes são triturados com recurso à máquina “Smart Dentin Grinder™” (SDG) durante 3 segundos, originando um particulado com cerca de 300-1200µm. Além disto, após o processo de trituração inicial, a câmara de trituração executa movimentos vibratórios durante vinte segundos que irão permitir que as partículas inferiores a 1200µm sejam deslocadas através de uma peneira para um compartimento inferior. Desta forma, irá ser garantida a obtenção de um particulado com dimensões compreendidas entre 300-1200µm, separando-se as partículas de tamanho inferior para uma segunda gaveta que irá ser desperdiçada, dado que as partículas inferiores a 300µm são consideradas pouco eficazes para enxerto ósseo devido à sua alta taxa de reabsorção e baixa capacidade de formação de novo osso (Binderman et al., 2014). As células com capacidade osteogénica, tais como os osteoblastos e células osteoprogenitoras, fixam-se preferencialmente na superfície de partículas de maiores dimensões (Koga et al., 2016).

As partículas são posteriormente imersas numa solução alcoólica básica (“cleanser”) durante 15 a 20 minutos, num recipiente de vidro estéril. A solução de 0,5M de hidróxido de sódio (NaOH) e 30% álcool (v/v) (“cleanser”) permite a dissolução de

resíduos orgânicos, bactérias e toxinas presentes no particulado (Binderman et al., 2014; Calvo-Guirado et al., 2018). Em seguida ao tratamento com a solução desinfetante (“cleanser”), o particulado de dentina é lavado com uma solução salina de tampão fosfato (PBS). O PBS é uma solução isotónica, não tóxica para a maioria das células que favorece a manutenção de um pH constante (Tabela 6) (Binderman et al., 2014; Calvo-Guirado et al., 2018).

Após todo o processo o particulado é seco, com o auxílio de uma compressa, dando origem a um particulado isento de bactérias pronto a ser utilizada como enxerto autógeno para procedimentos de regeneração óssea (Binderman et al., 2014).

O estudo de Binderman et al., em 2014 demonstrou que o particulado de dentina mineralizada autógena, leva cerca de 20 minutos para ser preparado. E ainda, que este mesmo particulado, mantém-se integrado no osso recém-formado permitindo a criação de um local adequado para a ancoragem de implantes dentários após 2-3 meses da realização do enxerto (Binderman et al., 2014; Khanijou et al., 2018).

Segundo Koga et al., 2016, a matriz de dentina mineralizada é biocompatível, é lentamente reabsorvida, porém é menos eficaz na formação de novo osso quando comparada a outros métodos de processamento da matriz de dentina autógena como a dentina parcialmente desmineralizada (Koga et al., 2016).

Já Calvo-Guirado et al., em 2017 realizaram um estudo animal de forma avaliar o material de enxerto derivado de dentes recém-extraídos, onde foram incluídos seis cães da raça *American Fox Hound*. Os dentes foram triturados e processados segundo o método anteriormente descrito por Binderman et al., 2014. Foram realizadas análises histológicas e histomorfométrica de forma a aferir a cicatrização tecidual e a formação óssea, que demonstraram que, com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), ocorreu maior percentagem de formação óssea no grupo experimental ($82,22 \pm 1,7\%$) do que o grupo controlo ($57,29 \pm 0,11\%$). Além de ter sido verificado menor percentagem de formação de osso imaturo no grupo experimental ($25,7 \pm 0,11\%$) do que no grupo controlo ($55,98 \pm 0,16\%$), aos 60 e 90 dias (Calvo-Guirado et al., 2017).



	1º Passo	2º Passo
		
Líquido	“Cleanser”	PBS
Composição	Solução básica alcoólica composta por 0,5M de NaOH e 30% de álcool (v/v)	Solução salina tampão fosfatada estéril
Procedimento	Cobrir o enxerto durante 10 min e desidratar com compressa esterilizada	Cobrir o enxerto durante 3 min e desidratar com compressa esterilizada
Duração	10min	3min

Tabela 6: Protocolo de processamento de matriz de dentina autógena mineralizada (Adaptado de Protocolo da Kometabio para processamento de matriz de dentina autógena mineralizada)

3.5.7 Processamento de dentina parcialmente desmineralizada

Este método, que constitui uma variação à técnica de processamento da matriz de dentina mineralizada previamente descrita por Binderman e seus colaboradores em 2014, surgiu de forma a ultrapassar as limitações associadas ao processo de desmineralização total da matriz de dentina (Binderman et al., 2014; Koga et al., 2016; Calvo-Guirado et al., 2018; Minamizato et al., 2017).

Sendo uma variação do protocolo de processamento da dentina mineralizada são várias as semelhanças entre as duas técnicas. À exceção que no método de processamento da dentina parcialmente desmineralizada, após a aplicação do “cleanser”, será aplicada adicionalmente, uma solução de ácido etilenodiaminatetra-acético (EDTA) a 10% por cerca de 2 min com vista à desmineralização parcial (Binderman et al., 2014; Calvo-Guirado et al., 2018). De seguida, o particulado de dentina é lavado durante 3 min com uma solução salina de fosfato tampão (PBS). O PBS é uma solução isotónica, não tóxica para a maioria das células que favorece a manutenção de um pH constante (Tabela 7) (Binderman et al., 2014; Calvo-Guirado et al., 2018).

Após o todo o processo o particulado é seco, com o auxílio de uma compressa, dando origem a um particulado isento de bactérias pronto a ser utilizada como enxerto autógeno para procedimentos de regeneração óssea (Binderman et al., 2014).

Este método de processamento, além de realizar uma desmineralização parcial da superfície dentinária na ordem dos 20µm, permite a obtenção de um particulado autógeno livre de bactérias, vírus e toxinas apto a ser utilizado em apenas 15 a 20 minutos (Calvo-Guirado et al., 2018; Binderman et al., 2014; Koga et al., 2016). Sendo conjecturável que a matriz de dentina parcialmente desmineralizada, devido ao tempo relativamente curto de preparação comparável com as técnicas de técnicas de desmineralização total e às suas características inerentes, tem o potencial de se tornar uma das melhores opções de tratamento no âmbito da regeneração óssea (Minamizato et al., 2017). Segundo Koga et al., a matriz de dentina parcialmente desmineralizada é mais osteoindutiva do que a matriz de dentina totalmente desmineralizada, visto, que a maior parte das NCP's e fatores de crescimento são libertados da matriz orgânica da dentina durante o processo de desmineralização (Koga et al., 2016). Além de que este tipo de processamento é mais rápido do que os processos de desmineralização total (Khanijou et al., 2018).

Em 2016, Koga e colaboradores, realizaram um estudo animal em ratos, cujos principais objetivos deste estudo eram, avaliar a influência da dimensão das partículas e do grau de desmineralização da matriz de dentina autógena na regeneração óssea. Sendo então as amostras divididas por grupo consoante as dimensões das partículas (200, 500, 1000µm) e de acordo com o grau de desmineralização (matriz de dentina mineralizada, matriz de dentina parcialmente desmineralizada e matriz de dentina totalmente desmineralizada. De acordo com os resultados obtidos foi demonstrado que, a matriz de dentina parcialmente desmineralizada, especialmente nas partículas de 1000µm, revelaram uma nova formação óssea mais rápida e consistente, quando comparado com os outros grupos (Koga et al., 2016). Foi também dito pelos mesmos que, quanto maior for a dimensão das partículas, maior será o tempo necessário para a respetiva desmineralização pretendida (Koga et al., 2016).




	1º Passo	2º Passo	3º Passo
			
Líquido	"Cleanser"	EDTA	PBS
Composição	Solução básica alcoólica composta por 0,5M de NaOH e 30% de álcool (v/v)	Ácido Etilenodiamino tetracético a 10%	Solução salina tampão fosfatada estéril
Procedimento	Cobrir o enxerto durante 10 minutos e desidratar com compressa esterilizada	Cobrir o enxerto durante 2 minutos e desidratar com compressa esterilizada	Cobrir o enxerto durante 3 minutos e desidratar com compressa esterilizada
Duração	10min	2min	3min

Tabela 7: Protocolo de processamento de matriz de dentina autógena parcialmente desmineralizada (Adaptado de Protocolo da Kometabio para processamento de matriz de dentina autógena parcialmente desmineralizada)

3.5.8 Processamento de dentina totalmente desmineralizada

O enxerto de matriz de dentina totalmente desmineralizada, derivado de dentes humanos extraídos, foi um método de processamento desenvolvido em 2008 por Kim e seus colaboradores (Kim et al., 2010; Kim et al., 2017).

Após a extração, os dentes são armazenados num recipiente com álcool a 75% num congelador, até os mesmos serem enviados para o Korea Tooth Bank (Seul, Coreia) para processamento. Primeiramente são removidas dos dentes as restaurações, cáries e restos de ligamento periodontal remanescente. Após isto, é realizado o processo de trituração e esmagamento, que irá permitir obter um particulado com um tamanho compreendido entre 200 e 1.000µm. De seguida, o particulado é lavado e submetido a um processo de descalcificação, desidratação, desengorduramento e liofilização. Por fim o particulado é esterilizado com óxido de etileno gasoso, embalado e então enviado para a clínica que solicitou o material, dado que o mesmo pode ser armazenado nas mesmas condições, em temperatura ambiente, durante cerca de 5 anos (Kim et al., 2010; Kim et al., 2014; Pang et al., 2016).

O processo de desmineralização permite proceder como antisséptico e antimicrobiano, tendo a vantagem de diminuir possíveis infeções locais, o que permite aumentar a taxa de sucesso. (Minamizato et al., 2017). Além disto, o processo de

desmineralização da matriz de dentina expõe os túbulos dentinários e aumenta o diâmetro dos mesmos, o que resulta na libertação de NCP's e fatores de crescimento que promovem a proliferação e diferenciação dos osteoblastos, logo a formação e remodelação óssea (Khanijou et al., 2018). Adicionalmente este método, sendo autógeno, elimina assim o risco de uma reação imunológica de corpo estranho bem como a transmissão de doenças infecto-contagiosas (Kim et al., 2010; Pang et al., 2016

Contudo o processamento da matriz de dentina totalmente desmineralizada, é um método muito demorado que leva horas ou até dias, além deste poder levar à destruição das proteínas e fatores de crescimento da matriz orgânica, sendo isto apontado como a principal desvantagem da técnica (Minamizato et al., 2017; Kim et al., 2015; Khanijou et al., 2018). Na maioria dos estudos clínicos, acerca da matriz de dentina totalmente desmineralizada, foram necessárias aproximadamente 12 horas para a desmineralização total da dentina. Já nas técnicas de desmineralização parcial apenas foram necessários cerca de 10 minutos para completar o processo (Minamizato et al., 2017). Além de que a matriz de dentina desmineralizada é frágil para permitir a ancoragem adequada de implantes dentários (Calvo-Guirado et al., 2018; Binderman et al., 2014).

Desde então a técnica tem sido alvo de variados estudos e de variadas modificações (Kim et al., 2017).

Em termos de estudos clínicos, Gomes et al. foi o primeiro a relatar a utilização de matriz de dentina desmineralizada autógena em alvéolos pós-extração (Gomes et al., 2006).

Vários estudos em animais demonstraram que a matriz de dentina desmineralizada não só é biocompatível, mas também osteoindutiva, apresentando semelhanças com a matriz óssea desmineralizada (Koga et al., 2016; Minamizato et al., 2017).

No estudo de Kim et al., 2010, onde foram incluídos um total de 6 pacientes, foi realizado a técnica de regeneração óssea com enxerto de matriz de dentina desmineralizada simultaneamente à da colocação do implante. Os resultados demonstraram, através de análise histomorfométrica, nova formação e remodelação óssea em 46%-87% dos defeitos. Após 6 meses, verificou-se a reabsorção da maior parte do material de enxerto e existência de novo osso formado (Kim et al., 2010).

Kim et al., em 2014, realizaram um estudo animal, onde foram incluídos vinte ratos, de forma a provarem a capacidade osteoindutiva da matriz de dentina autógena totalmente desmineralizada. Os resultados demonstraram que a matriz de dentina totalmente desmineralizada induziu a formação de novo osso, dado que o exame

histológico verificou a presença de células com capacidade osteogénica tais como osteoblastos, às duas, quatro e oito semanas (Kim et al., 2014).

Já Pang et al., em 2016 realizaram um estudo prospetivo randomizado, onde foram incluídos um total de 33 locais de enxerto em 24 pacientes, cujo objetivo foi avaliar a eficácia clínica da matriz de dentina autógena desmineralizada comparativamente com o xenoenxerto. Os resultados demonstraram que a matriz de dentina desmineralizada autógena foi tão eficaz na formação de novo como o xenoenxerto. Sugerindo então que o material de enxerto derivado de dentes autógenos é uma opção viável para a regeneração óssea (Pang et al., 2016).

Apesar de diversos estudos recentes relatarem que a matriz de dentina autógena totalmente desmineralizada é capaz de fornecer resultados semelhantes ou superiores aos obtidos com outros substitutos ósseos, não existe, no entanto, evidência suficiente no que diz respeito a resultados a longo prazo, o que obriga à necessidade da execução de mais estudos que abranjam um maior número de casos com um maior período de acompanhamento (Kim et al., 2016).

4. Evidência Científica

Para a realização deste trabalho de investigação, foi executada uma revisão da literatura focada na utilização da matriz de dentina autógena humana enquanto potencial material de regeneração óssea, tendo a pesquisa dos artigos sido efetuada nas plataformas agregadoras de bases de dados “Pubmed” e “B-on”. As palavras chave aplicadas foram “dentin processing”, “autogenous dentin graft”, “autogenous dentin matrix”, “bone regeneration”, “tooth extraction”, “tooth graft” e “dentin matrix graft”, tendo sido escolhidos os artigos publicados entre 2006 e 2018, publicados em inglês.

Não foi verificado a existência de meta-análises acerca do tema, porém verificou-se a existência de duas revisões sistemáticas acerca dos vários métodos descritos de processamento da matriz de dentina para a utilização como material de enxerto para regeneração óssea.

Na revisão de Tabatabaei et al., (2016) foi realizada uma revisão sistemática acerca dos diferentes métodos de processamento da matriz de dentina e qual a eficácia dos mesmos. Para tal foram selecionados 36 artigos publicados entre 2000 e 2016 que permitem concluir, a Tabatabaei et al., (2016), que o protocolo de processamento

aplicado, a dimensão e a forma das partículas de dentina desempenham um papel importante nas propriedades osteoindutivas e osteocondutivas da mesma.

Na revisão de Khanijou et al., (2018) foi realizada uma revisão com o intuito de discutir as semelhanças entre o osso e o dente, bem como discutir o uso e aplicação do enxerto derivado de dentes humanos.

Na tabela 8, encontram-se presentes os estudos clínicos em humanos descritos nas revisões sistemáticas encontradas (Tabatabaei et al., 2016; Khanijou et al., 2018).

Autor	Data	Tipo de estudo e amostra	Enxerto	Local de enxerto	Resultados
Murata, M.	2003	Relato de caso, $n=1$	Particulado de dentina autógena desmineralizada	Elevação de seio maxilar (zona dos dentes 24 a 26)	Após 5 meses de pós-operatório, 3 implantes puderam ser colocados na zona do enxerto. O exame histológico revelou tecido ósseo maduro, associado a remanescente do enxerto de particulado de dentina desmineralizada.
Gomes, M. et al.	2006	Estudo de caso, $n=27$	Matriz de dentina autógena desmineralizada (ADDM)	Alvéolos dentários de terceiros molares inferiores	O exame radiológico demonstrou maior radiopacidade óssea homogénea no grupo ADDM + PTFE do que no grupo Controlo + PTFE. O enxerto de ADDM desapareceu progressivamente do alvéolo intervencionado, sugerindo a sua reabsorção à medida

					que ocorre o processo de remodelação óssea.
Kim, Y. et al	2010	Série de Casos, $n=6$	Dente autógeno (AutoBT)	Maxila: 5 Mandíbula: 1	O exame histológico revelou reabsorção progressiva do material, que foi substituído por novo tecido ósseo. Novo osso formou-se por união direta ao AutoBT residual. Foi verificado 87% de formação de novo osso.
Kim, Y. et al	2011	Relato de Caso, $n=2$	Enxerto ósseo de dente autógeno na forma de pó ou blocos	Preservação alveolar em mandíbula e maxila, com elevação de seio maxilar simultânea	Boa cicatrização. Após 3-3,5 meses da realização do enxerto, foi possível a colocação de implante.
Kim, Y. et al	2011	Relato de Caso, $n=1$	Pó de dente-osso autógeno	Mandíbula	Estabilidade inicial superior. Excelente cicatrização e regeneração periodontal.
Kim, Y. et al	2011	Relato de Caso, $n=1$	Pó de dente-osso autógeno	Maxila anterior atrófica	Enxerto ósseo em combinação com expansão da crista óssea demonstrou cicatrização favorável.

Lee, J. et al	2012	Estudo Retrospetivo Cohort, $n=54$	AutoBT	Maxila e mandíbula	O enxerto ósseo de dente autógeno foi confirmado como sendo um procedimento seguro, demonstrando excelente cicatrização óssea, no espaço de 2 anos.
Park, S. et al.	2012	Estudo de Caso, $n=133$	AutoBT do tipo bloco, pó ou combinação de ambos	Maxila e Mandíbula	A perda média de osso na mandíbula, após 6 meses de colocação de prótese em carga, foi de 0,29 mm.
Kim et al.	2013	Estudo de Caso, $n=12$	Bloco de dentina autógena	Defeitos peri-implantares mandibulares	Verificou-se ótima cicatrização óssea em todos os pacientes. Não ocorreu osteointegração do implante em nenhum paciente.
Kabir, M. et al.	2014	Relato de Caso, $n=2$	Matriz de dentina desmineralizada (DDM)	Maxila anterior e Mandíbula posterior (terceiros molares)	As radiografias após 1 ano de pós-operatório demonstraram excelente cicatrização óssea. Radiografias pós-operatórias mostraram que o alvéolo, resultante da extração dentária, cicatrizou por completo com novo tecido ósseo.

Binderman, I. et al.	2014	Série de Casos, $n > 100$	Particulado de dentina autógena	Maxila e Mandíbula	Após 4 meses da colocação do particulado de dentina autógena em 48 alvéolos dentários, verificou-se formação de novo tecido ósseo. Ausência de sinais de perda óssea peri-implantar, após a colocação de implantes em zonas de enxerto.
Pohl, V. et al.	2016	Relato de Caso, $n = 6$	Particulado de dentina	Maxila	Cicatrização pós-operatória normal com reabilitação protética. A profundidade de sondagem peri-implantar média após 5 anos foi de 1.86 mm (mesiolingual) e 2.07 mm (distovestibular). A média de reabsorção óssea peri-implantar durante o primeiro ano foi de 0.63 mm. O exame histológico demonstrou ocorrência dos fenômenos de osteocondução e osteoindução, ocorrendo a encapsulação da dentina e esmalte do dente com reabsorção parcial do enxerto de dente particulado. Teste

					imuno-histoquímico revelou a formação de novos vasos sanguíneos nas zonas onde se efetuou o enxerto.
Kim, Y. et al.	2016	Estudo Prospetivo Longitudinal, $n=5$	Matriz de Dentina Desmineralizada	Maxila: 4 Mandíbula: 1	Todos os casos demonstraram a ocorrência de formação óssea após 5 anos e 5.8 meses. Verificou-se uma perda de altura óssea vestibular (-0.4 a -3.3 mm) e de largura da crista alveolar (-0.4 a -4.2 mm). As alterações ósseas verificadas variaram entre -8.1 e -36.2%.
Joshi, C. et al.	2016	Ensaio Clínico Randomizado, $n=45$	Enxerto de dente autógeno (ATG)	Maxila: 18 Mandíbula: 12	Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas na largura e altura da crista do osso alveolar nos três grupos de estudo. Os locais que receberam o ATG demonstraram resultados superiores, verificando-se perdas mínimas de altura e largura ósseas. O exame histológico revelou que os locais que receberam o ATG tiveram maior formação óssea.

Kim, Y. et al.	2017	Série de Casos, $n=22$	Bloco de matriz de dentina desmineralizada (ABTB)	Maxila: 12 Mandíbula: 10	O ABTB foi incorporado e remodelado em osso cortico- esponjoso. A forma e o volume ósseo foi mantido, registando-se apenas uma mínima perda óssea.
Joshi, C. et al.	2017	Ensaio Clínico Randomizado, $n=45$	Enxerto de dente alógeno	Maxila: 26 Mandíbula: 19	Os locais onde se utilizou enxerto alógeno de dente completo e enxerto alógeno de dentina demonstraram melhores resultados ao nível de redução da largura e altura do osso alveolar crestal, quando comparados com os locais controlo e onde se aplicou FDBA (enxerto alógeno de osso liofilizado). A análise histológica revela uma maior formação óssea nos locais de enxerto de dente alógeno
Kim, Y. et al.	2017	Estudo de Caso, $n=18$	Enxerto alógeno de matriz de dentina desmineralizada (DDM)	Maxila: 10 Mandíbula: 8	Não foram verificadas complicações. Verificou-se a encapsulação das partículas de DDM por tecido fibroso altamente celularizado

					e formação de novo tecido ósseo. As partículas de DDM raramente foram vistas no tecido ósseo recém-formado.
Pang, K. et al.	2017	Estudo Clínico Randomizado, $n=33$	Enxerto de dente autógeno (AutoBT)	Maxila: 21 Mandíbula: 12	<p>Tanto o grupo que recebeu o xenoenxerto de Bio-OssTM como o grupo que recebeu o enxerto AutoBT apresentaram uma cicatrização favorável, estabilidade implantar e confirmação histológica de formação de osso.</p> <p>Histomorfometricamente, a formação de novo osso nos locais com enxerto AutoBT foi de $31.24 \pm 13.87\%$, enquanto que nos locais com enxerto Bio-OssTM foi de $35.00 \pm 19.33\%$.</p> <p>O quociente de estabilidade implantar (ISQ) dos implantes colocados nos locais em que se recorreu ao enxerto de AutoBT foi de 72.80 ± 10.81, enquanto que nos locais em que se recorreu ao enxerto de Bio-OssTM foi de 70.0 ± 12.86.</p>

Minami zato, T. et al.	2018	Estudo Piloto, $n=16$	Matriz de dentina autóloga parcialmente desmineralizada (APDDM)	Maxila: 9 Mandíbula: 7	Foi efetuada preservação alveolar com colocação de implante após 4-6 meses em 7 pacientes, não foi perdido nenhum implante com follow- up de 24 meses. Em 3 pacientes foi efetuada cirurgia de elevação do seio maxilar e as imagens da TC indicam aumento e remodelação óssea. Em 6 pacientes foi efetuado enxerto ósseo com APDDM, com colocação imediata de implante. Numa segunda cirurgia 3 meses após a colocação do implante, verificou- se que o material de enxerto APDDM foi substituído por um tecido semelhante a osso sem perdas de implantes com 24 meses de follow-up. O exame histológico, efetuado a 4 pacientes, demonstrou a existência de novo tecido ósseo ao redor do enxerto de APDDM.
------------------------------	------	--------------------------	-----------------------------------------------------------------------------	------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Tabela 8: Utilização da matriz de dentina como enxerto autólogo (Khanijou et al., 2018; Tabatabaei et al., 2016)

De uma forma geral, todos os estudos clínicos particularizados na tabela 8 adquiriram resultados e conclusões idênticas entre si. Foi então demonstrada a biocompatibilidade do enxerto de matriz de dentina, dado que em todas as situações foi verificada uma boa cicatrização pós-operatória, osteocondução, osteoindução, capacidade de resistência para ancoragem de implantes, formação óssea e integração tecidular. Não foram relatados insucessos relativamente à taxa de permanência dos implantes colocados após o enxerto de dentina (Tabatabei et al., 2016).

II. Objetivos e hipóteses

1. Objetivos do estudo

Este trabalho de investigação é um estudo piloto experimental “*in vitro*” onde será avaliado e comparado qual o impacto do protocolo do processamento de matriz de dentina autógena mineralizada e parcialmente desmineralizada relativamente à abertura dos túbulos dentinários. Será feita uma avaliação e respetiva comparação, com recurso a microscopia eletrónica de uma amostra de dentes íntegros sujeitos a estes dois tipos de procedimento.

2. Hipóteses do estudo

- **H 1.0 (hipótese nula):** Não existem diferenças estatisticamente significativas na abertura dos túbulos dentinários após imersão do particulado de dentina autógena numa solução alcoólica básica (dentina mineralizada) ou com aplicação de uma solução de EDTA a 10% (dentina parcialmente desmineralizada) após análise com recurso a microscopia eletrónica.
- **H 1.1 (hipótese teste):** Existem diferenças estatisticamente significativas na abertura dos túbulos dentinários após imersão do particulado de dentina autógena numa solução alcoólica básica (dentina mineralizada) ou com aplicação de uma solução de EDTA a 10% (dentina parcialmente desmineralizada) após análise com recurso a microscopia eletrónica.

III. Materiais e métodos

1. Tipo de estudo

Estudo de investigação piloto experimental “*in vitro*”.

2. Local de realização do estudo

Este estudo de investigação piloto experimental “*in vitro*” foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrónica e Histomorfologia (Cmicros) do Centro de Investigação Interdisciplinar da Egas Moniz (CiiEM).

3. Amostra

A amostra é constituída por 60 dentes íntegros extraídos por motivos periodontais, ortodônticos, terceiros molares inclusos e dentes total ou parcialmente impactados, na Clínica Dentária Egas Moniz, tendo sido estes triturados com recurso à máquina “Smart Dentin Grinder™”. Foram excluídos dentes endodonciados e com restaurações ou cáries extensas. Os 60 dentes foram distribuídos equitativamente por três grupos de estudo, sendo cada grupo constituído pelas respetivas 20 amostras. Em cada amostra foram avaliados aleatoriamente 50 túbulos dentinários, dando um total de 1000 túbulos dentinários avaliados por grupo, perfazendo um total de 3000 túbulos dentinários avaliados. Em cada amostra foram recolhidas 5 imagens, dando um total de 100 imagens por grupo, dado que cada imagem representa uma partícula de dentina diferente.

4. Materiais

- Brocas esféricas de carbide de tungsténio
- Cureta Gracey
- “Smart Dentin Grinder™” (Kometabio, USA)
- Solução básica alcoólica composta por 0,5M de NaOH e 30% de álcool (v/v) (“cleanser”)
- Solução de EDTA a 10%

- Solução salina tampão fosfatada estéril (PBS)
- Dentes humanos
- Cápsulas de trituração esterilizadas
- Pipetas de plástico
- Godés esterilizados
- Máquina de evaporação a vácuo JEE-400
- Paládio
- Microscópio eletrônico de varrimento (SEM) – JSM-5400

5. Grupos de estudo

Foram definidos três grupos de estudo: Grupo A (controle-sem tratamento), Grupo B (dentina mineralizada) e Grupo C (dentina parcialmente desmineralizada), de acordo com o respetivo processamento aplicado. Em cada grupo constam 20 dentes dando um total de 60 dentes, conforme representa a tabela 9:

Grupo A (controle) <i>n=20</i>	Grupo B (dentina mineralizada) <i>n=20</i>	Grupo C (dentina parcialmente desmineralizada) <i>n=20</i>
Sem tratamento	Aplicação de “cleanser” durante 10 minutos + Aplicação de PBS durante 3 minutos	Aplicação de “cleanser” durante 10 minutos + Aplicação de EDTA a 10% durante 2 minutos + Aplicação de PBS durante 3 minutos

Tabela 9: Grupos de estudo

6. Protocolo experimental

Preparação do dente

1. Eliminação do tecido periodontal e cálculo dentário associado ao dente extraído com o auxílio de cureta de gracey e broca de tungsténio (Figura 1)
2. Secagem do dente com seringa de ar

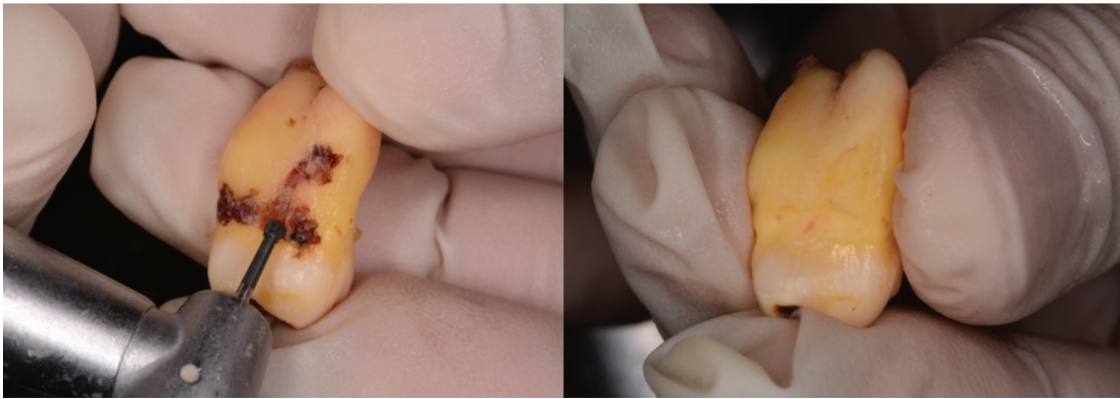


Figura 1: Preparação do dente com broca de tungstênio para o processamento

Trituração do dente com a máquina “Smart Dentin Grinder™”

3. Coloca-se o dente no interior da câmara de trituração da máquina “Smart Dentin Grinder™” a alinham-se as marcações para encaixar a câmara esterilizada na máquina (Figura 2)



Figura 2: Dente dentro da câmara da máquina “Smart Dentin Grinder™”

4. Roda-se a câmara da máquina no sentido anti-horário para trancar o sistema
5. Seleciona-se a opção GRIND, e pressiona-se UP e DOWN de forma a definir a definir o tempo de trituração (3 segundos) (Figura 3)
6. Seleciona-se a opção SORT, pressionando-se UP e DOWN de forma a definir o tempo de separação (20 segundos) (Figura 3)
7. Seleciona-se a opção START para iniciar o processo (Figura 3)

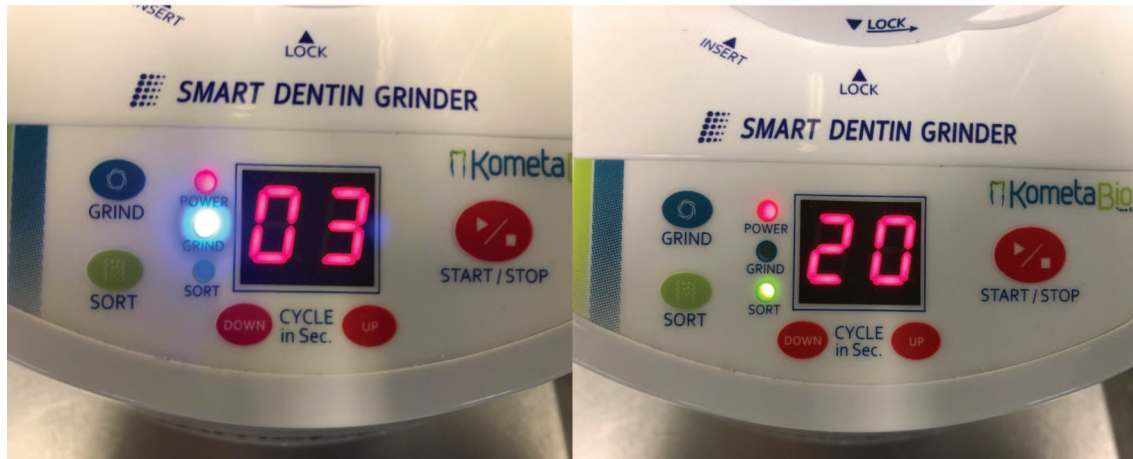


Figura 3: Seleção das definições adequadas no painel para a trituração do dente

8. Abre-se o compartimento superior que possui o particulado com as dimensões pretendidas (300-1200 μ m), sendo desperdiçado o particulado com dimensões inferiores a 300 μ m presente no compartimento inferior (Figura 4 e Figura 5)



Figura 4: Particulado de enxerto de dentina autógena humana, obtido após trituração. (Compartimento superior e inferior respetivamente)



Figura 5: Particulado de dentina autógena humana com as dimensões pretendidas situadas entre 300 e 1200 μ m

9. Disposição do particulado pelos grupos de estudo estipulados (Figura 6)

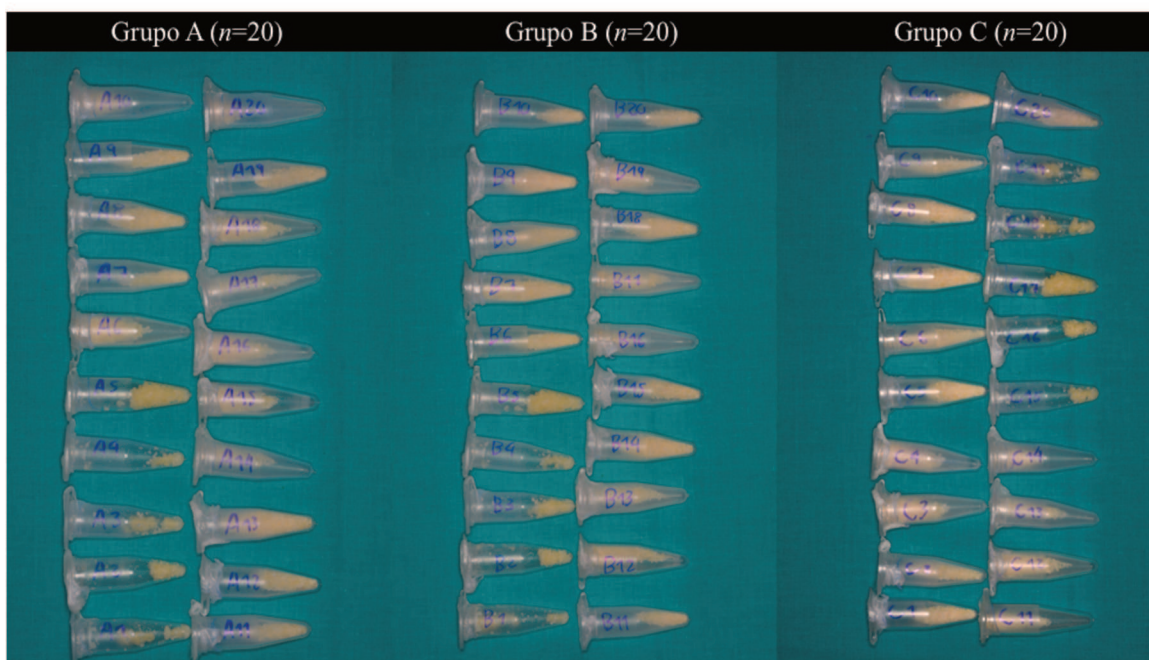


Figura 6: Particulado de dentina autógena humana distribuído pelos respectivos grupos de estudo (Ver tabela 7: Grupos de estudo)

Tratamento do particulado com a soluções (Figura 7)

10. Coloca-se o particulado num godé esterilizado e aplica-se o “cleanser” durante 10 minutos
11. Após a ação do “cleanser”, o mesmo é removido com auxílio de uma pipeta e compressa esterilizadas
12. Aplicação do EDTA a 10% durante 2 minutos (passo aplicável apenas ao grupo C – dentina parcialmente desmineralizada)
13. Após a ação do EDTA, o mesmo é removido com auxílio de uma pipeta e compressa esterilizadas (passo aplicável apenas ao grupo C – dentina parcialmente desmineralizada)
14. Aplicação de PBS durante 3 minutos
15. Após a ação do PBS, o mesmo é removido com auxílio de uma pipeta e compressa esterilizadas



Figura 7: Soluções aplicadas ao particulado de dentina, “cleanser”, EDTA e PBS respetivamente

Recobrimento das amostras com paládio

16. As amostras numeradas são colocadas num suporte metálico para o recobrimento (Figura 8)

17. As amostras são colocadas no interior da máquina de evaporação a vácuo JEE-400, onde são recobertas com partículas de paládio, de forma a permitir a observação das amostras com recurso ao SEM (Figura 9)

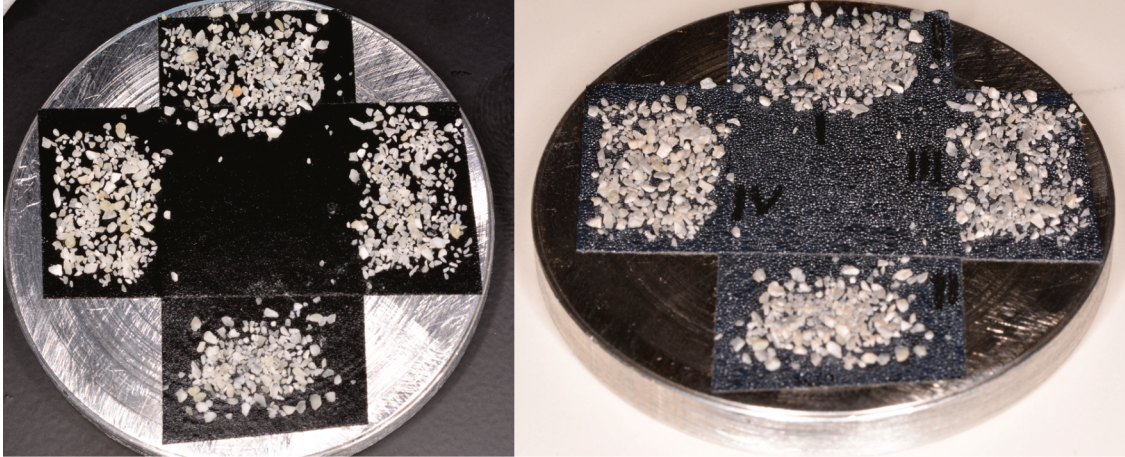


Figura 8: Amostras de particulado antes e depois do recobrimento com paládio respetivamente



Figura 9 Máquina de evaporação a vácuo JEE-400

Observação ao Microscópio eletrónico de varrimento (SEM) – JSM-5400

18. As amostras são observadas com uma magnificação de 1000x, com uma distância de trabalho de 13mm e com alta voltagem de 20Kv (Figura 10)



Figura 10: Microscópio eletrônico de varrimento (SEM) – JSM-5400

Medição do diâmetro dos túbulos dentinários

19. Determinação do diâmetro dos túbulos dentinários das várias amostras através do programa informático “ImageJ” (Figura 11)

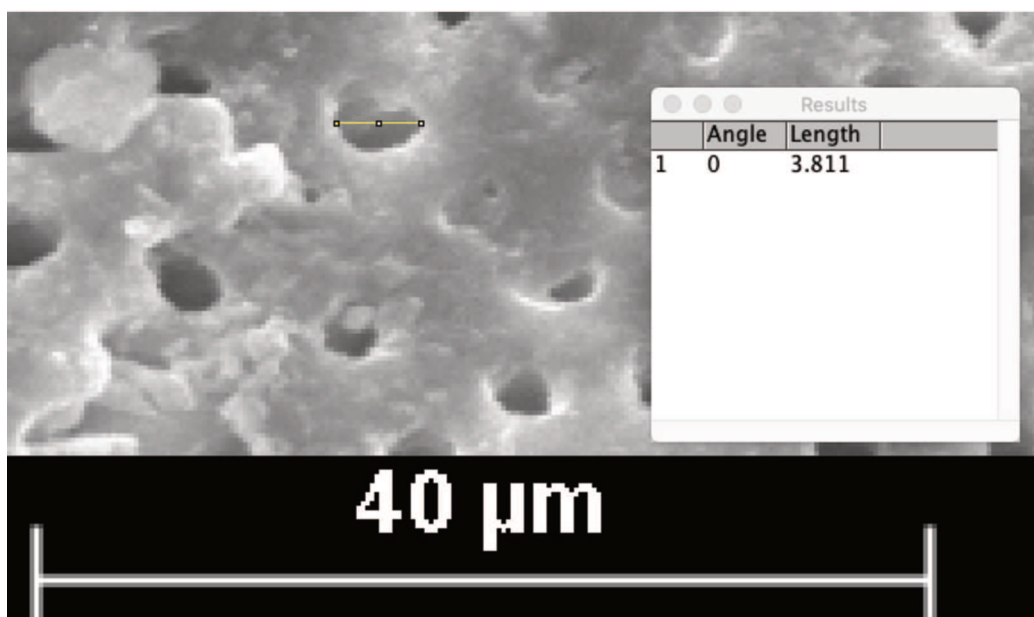


Figura 11: Determinação do diâmetro dos túbulos dentinários através do programa “ImageJ”

IV. RESULTADOS

1. Determinação do diâmetro dos túbulos dentinários

Foram obtidas imagens ao microscópio eletrónico de varrimento (SEM) das amostras dos respetivos grupos de estudo (Ver Tabela 10: Grupos de estudo)

Grupo A (controlo) <i>n</i> =20	Grupo B (dentina mineralizada) <i>n</i> =20	Grupo C (dentina parcialmente desmineralizada) <i>n</i> =20
Sem tratamento	Aplicação de “cleanser” durante 10 minutos + Aplicação de PBS durante 3 minutos	Aplicação de “cleanser” durante 10 minutos + Aplicação de EDTA a 10% durante 2 minutos + Aplicação de PBS durante 3 minutos

Tabela 10: Grupos de estudo

Em cada grupo foram avaliadas as respetivas 20 amostras e em cada amostra foram avaliados 50 túbulos dentinários, dando um total de 1000 túbulos dentinários avaliados por grupo. Em cada amostra foram recolhidas 5 imagens, dando um total de 100 imagens por grupo, dado que cada imagem representa uma partícula de dentina diferente.

Na figura 12 podemos observar a superfície de uma partícula de dentina pertencente ao **Grupo A** (controlo) que não sofreu ação da solução desinfetante (“cleanser”) e/ou EDTA. É de salientar a presença de inúmeros túbulos dentinários dispersos pela superfície juntamente com vários fragmentos de esmalte.

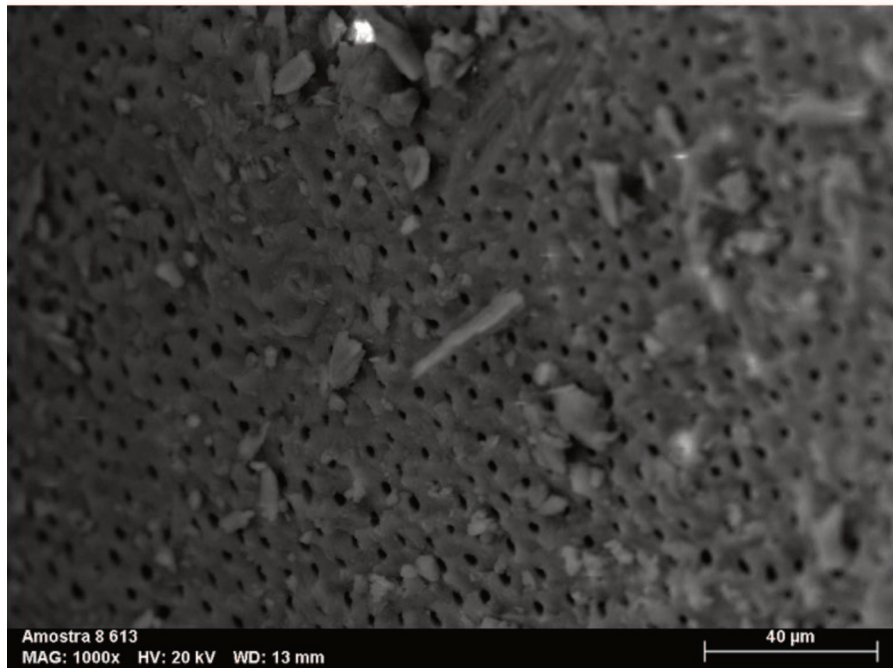


Figura 12: Uma das partículas de dentina do **Grupo A**, observada ao SEM (1000x)

Nas figuras 13 podemos observar a superfície de uma partícula de dentina pertencente ao **Grupo B** (dentina mineralizada) após ter sofrido ação da solução desinfetante (“cleanser”). Tal como observado na figura 12 é de salientar a presença de inúmeros túbulos dentinários dispersos pela superfície juntamente com vários fragmentos de esmalte. Porém, quando comparados os diâmetros dos túbulos dentinários analisados com os do grupo A, verifica-se que os mesmos apresentam um maior calibre.

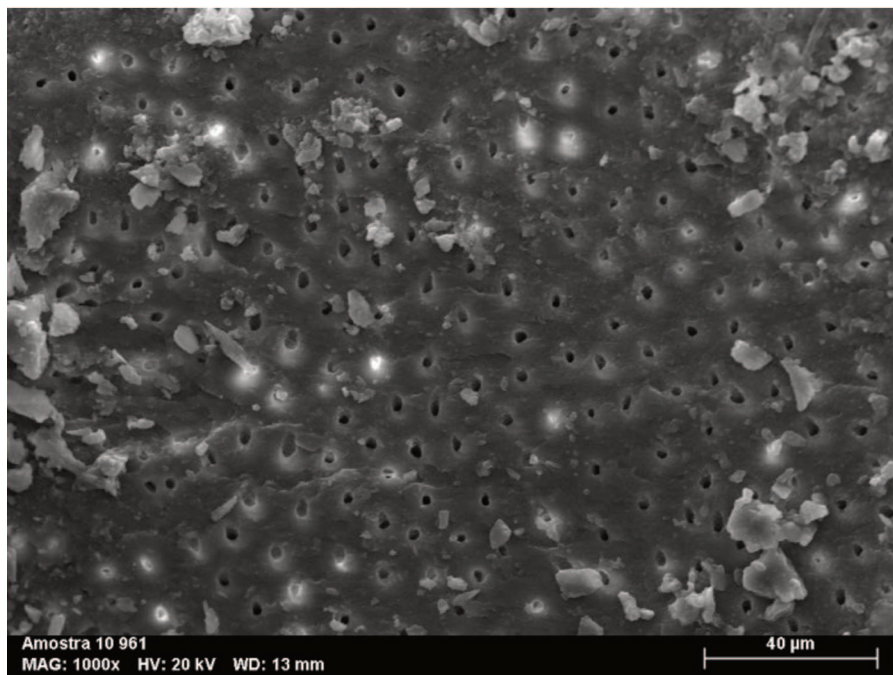


Figura 13: Uma das partículas do **Grupo B**, observada ao SEM (1000x)

Na figura 14 podemos observar a superfície de uma partícula de dentina pertencente ao **Grupo C** (dentina parcialmente desmineralizada) após ter sofrido ação da solução desinfetante (“cleanser”) e de EDTA. Tal como observado nas figuras 12 e 13 é de salientar a presença de inúmeros túbulos dentinários dispersos pela superfície juntamente com vários fragmentos de esmalte. Porém, quando comparados os diâmetros dos túbulos dentinários analisados com os do grupo A e do grupo B, verifica-se que os mesmos apresentam um maior calibre.

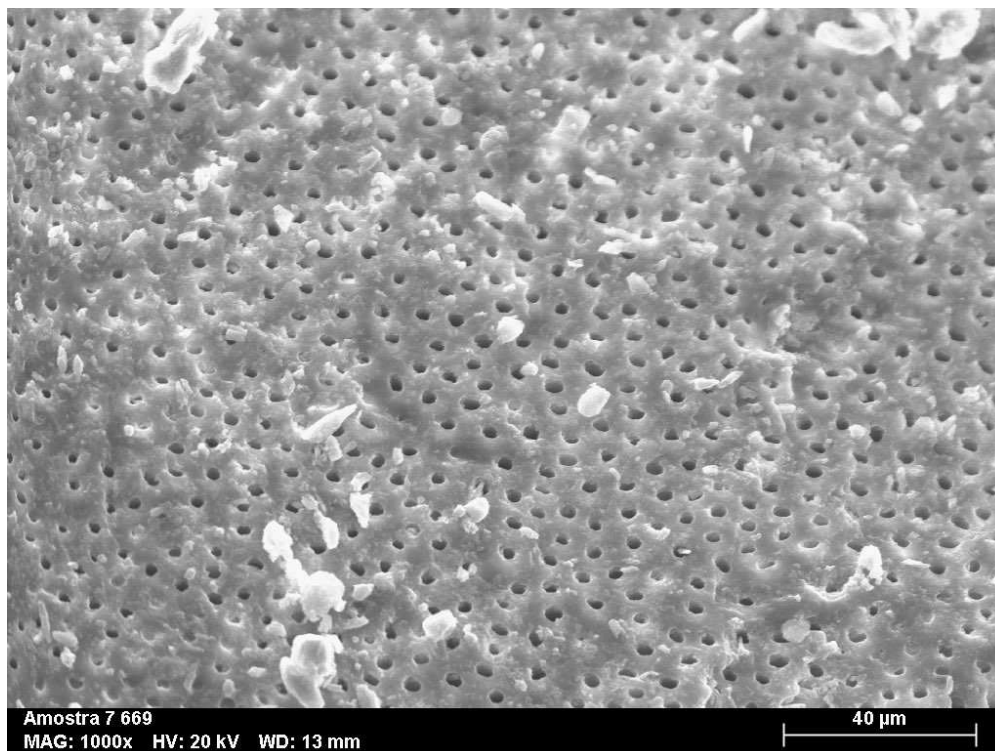


Figura 14: Uma das partículas do **Grupo C**, observada ao SEM (1000x)

Com recurso ao programa informático “ImageJ”, foram medidos aleatoriamente o diâmetro de 50 túbulos dentinários de cada amostra através das imagens obtidas, perfazendo um total de 3000 túbulos dentinários medidos. Inicialmente, foi feita a medição da escala da imagem de forma a ser realizada a calibração da régua digital tal como está representado na figura 15.

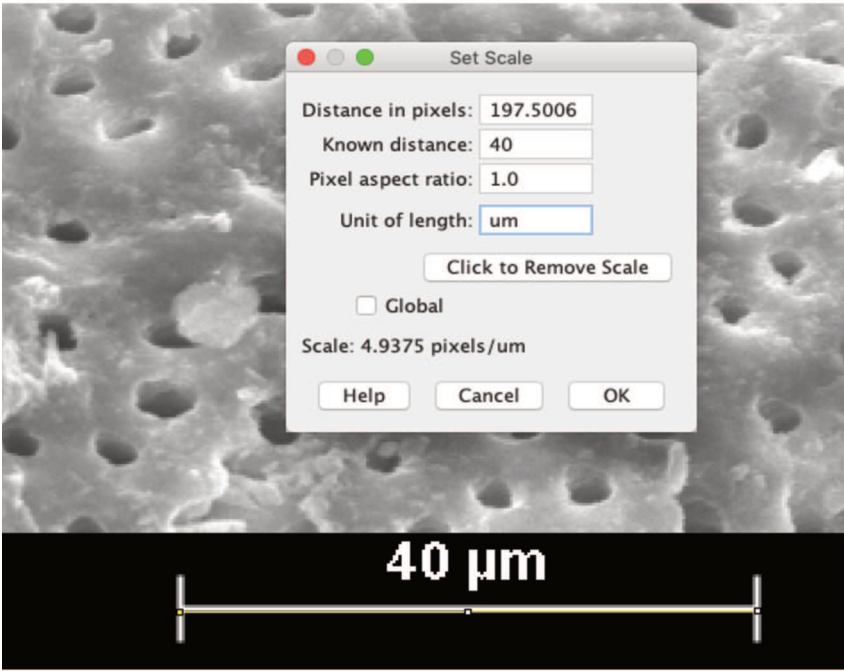


Figura 15: Medição da escala da imagem para calibração da régua digital com o programa informático “ImageJ”

Após a calibração é iniciada a medição dos túbulos dentinários, o valor de cada medição é transposto automaticamente para uma tabela (Figura 16).

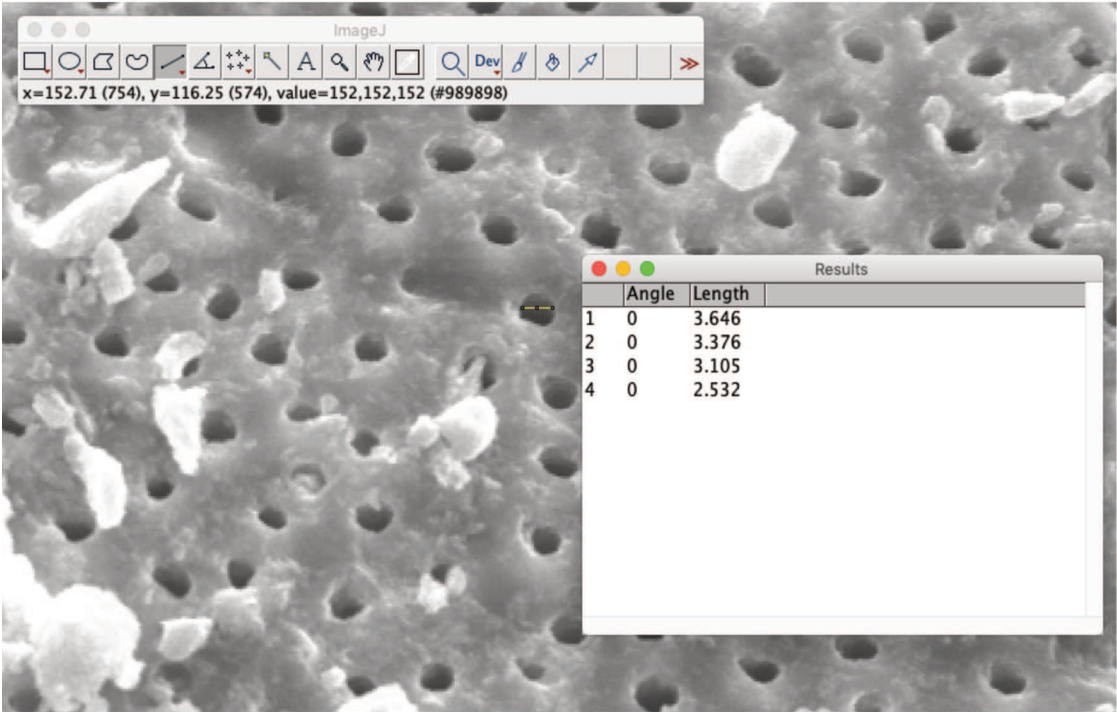


Figura 16: Medição do diâmetro dos túbulos dentinários de uma partícula de dentina com o programa informático “ImageJ”

A medição dos túbulos, além de ter sido realizada de forma aleatória, foi feita na sua totalidade com um ângulo de 0 graus, o que permitiu que todos os túbulos fossem avaliados da mesma forma e com o mesmo critério, aumentando a reprodutibilidade e aleatoriedade dos testes realizados (Figura 17). Todas as avaliações foram feitas por um único operador (JT). De forma a ser efetuada a calibração intra-examinador foram selecionados aleatoriamente túbulos de uma amostra e feitas as respectivas medições. Tendo as mesmas medições sido repetidas após uma semana, foi verificado uma concordância dos resultados de 90%.

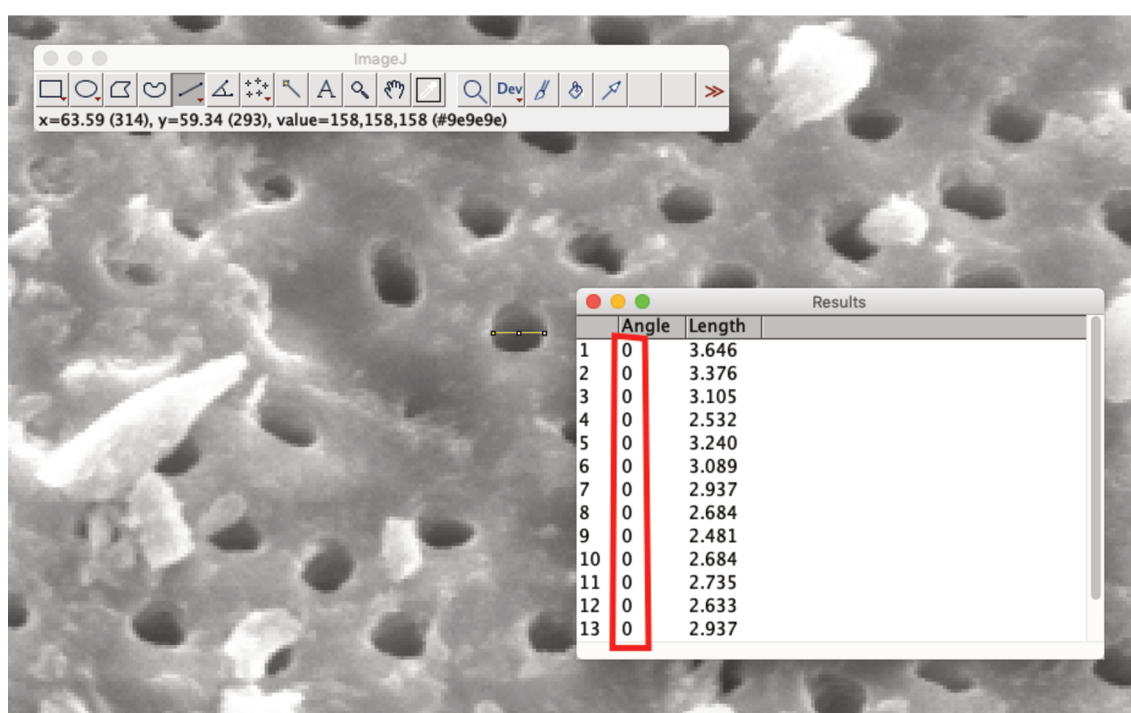


Figura 17: Critério de medição dos túbulos dentinários de uma partícula de dentina com o programa informático “ImageJ”

2. Metodologia da análise estatística

Na análise geral da amostra as variáveis numéricas são resumidas através da média, desvio padrão (DP), erro padrão (EP), intervalo de confiança para a média (IC 95%), mínimo e o máximo.

Para avaliar a hipótese de estudo, verificando-se igualdade de variâncias e dados homogêneos com distribuição normal, foi utilizado o teste One-way ANOVA com comparações múltiplas de Tuckey.

A análise estatística foi realizada com recurso ao programa informático IBM SPSS versão 24.0,2016 (IBM Corporation, New York, USA).

3. Caracterização estatística da amostra

A Tabela 11 apresenta os resultados referentes à estatística descritiva do diâmetro dos túbulos dentinários consoante o grupo respetivo. Nesta mesma tabela podemos observar que as médias do diâmetro dos túbulos dentinários variam de acordo com o grupo, o mesmo se aplica ao desvio padrão e intervalo de confiança (95%).

Relativamente aos grupos, a média do diâmetro dos túbulos dentinários do Grupo A = $1,401 \pm 0,285$ (controlo) é inferior à média do diâmetro dos túbulos dentinários do Grupo B = $2,123 \pm 0,303$ (dentina mineralizada). No diz respeito ao Grupo B, a média do diâmetro dos túbulos dentinários deste é inferior ao do Grupo C = $3,323 \pm 0,415$ (dentina parcialmente desmineralizada).

Tendo o Grupo C a média mais alta no que se refere à abertura dos túbulos dentinários.

Grupo	n	Número de túbulos dentinários	Média	DP	Intervalo de confiança (95%)		Mínimo	Máximo
					Limite superior	Limite inferior		
A-Controlo	20	1000	1,401	0,285	1,534	1,267	0,978	1,822
B-Dentina mineralizada	20	1000	2,123	0,303	2,265	1,981	1,599	2,661
C-Dentina parcialmente desmineralizada	20	1000	3,323	0,415	3,517	3,128	2,547	4,073

Tabela 11: Estatística descritiva do diâmetro dos túbulos dentinários consoante o grupo

Verificou-se a existência de homogeneidade e de uma distribuição normal para todos os grupos de estudo, dado que não foi necessário recorrer a eliminação de *outliers* (Tabela 12).

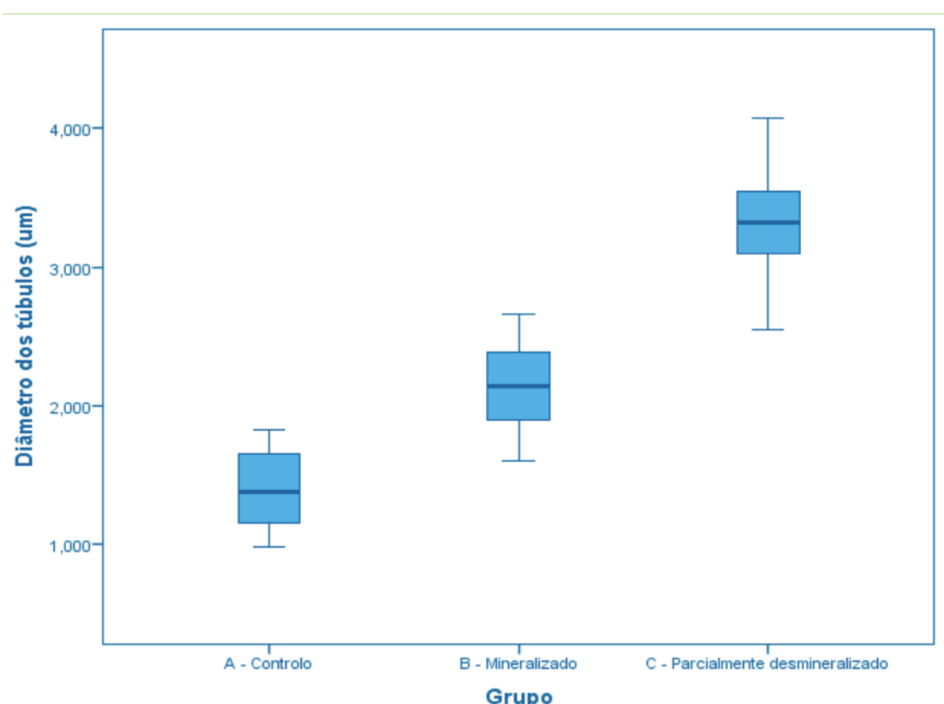


Tabela 12: Boxplot representativo do diâmetro dos túbulos dentinários dos grupos de estudo

Foi realizado um teste One-way ANOVA (Tabela 13), para amostras homogêneas e com distribuição normal, seguido de um teste de comparações múltiplas de Tuckey (Tabela 14).

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) entre os grupos de estudo no que diz respeito à abertura dos túbulos dentinários consoante o processamento aplicado (Tabela 13 e Tabela 14).

	Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Significância
Entre Grupos	37,710	2	18,855	163,188	0,000
Nos grupos	6,586	57	0,116		
Total	44,296	59			

Tabela 13: Estatística descritiva do diâmetro dos túbulos dentinários consoante o grupo segundo teste One-way ANOVA

(I) Grupo	(J) Grupo	Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Significância	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
A – Controlo	B - Mineralizado	-0,722700	0,107491	0,000	-0,98137	-0,46403
	C - Parcialmente desmineralizado	-1,922300	0,107491	0,000	-2,18097	-1,66363
B -Mineralizado	A - Controlo	0,722700	0,107491	0,000	0,46403	0,98137
	C - Parcialmente desmineralizado	-1,199600	0,107491	0,000	-1,45827	-0,94093
C -Parcialmente desmineralizado	A - Controlo	1,922300	0,107491	0,000	1,66363	2,18097
	B -Mineralizado	1,199600	0,107491	0,000	0,94093	1,45827

Tabela 14: Estatística descritiva do diâmetro dos túbulos dentinários consoante o grupo segundo o teste de Tuckey

Verifica-se com diferenças estatisticamente significativas, ($p < 0,001$) que as médias dos diâmetros dos túbulos dentinários do Grupo A = $1,401 \pm 0,285$ (controlo) e do Grupo B = $2,123 \pm 0,303$ (dentina mineralizada) são mais baixas do que a média do diâmetro dos túbulos dentinários do Grupo C = $3,323 \pm 0,415$ (dentina parcialmente desmineralizada), tendo este último a média mais alta

Estes dados permitem afirmar que o tratamento do particulado de dentina autógena humana com uma solução alcoólica básica desinfetante “cleanser” seguido da aplicação de EDTA (Grupo C - dentina parcialmente desmineralizada) permite a maior abertura dos túbulos dentinários quando comparado com os restantes grupos (Tabela 15).

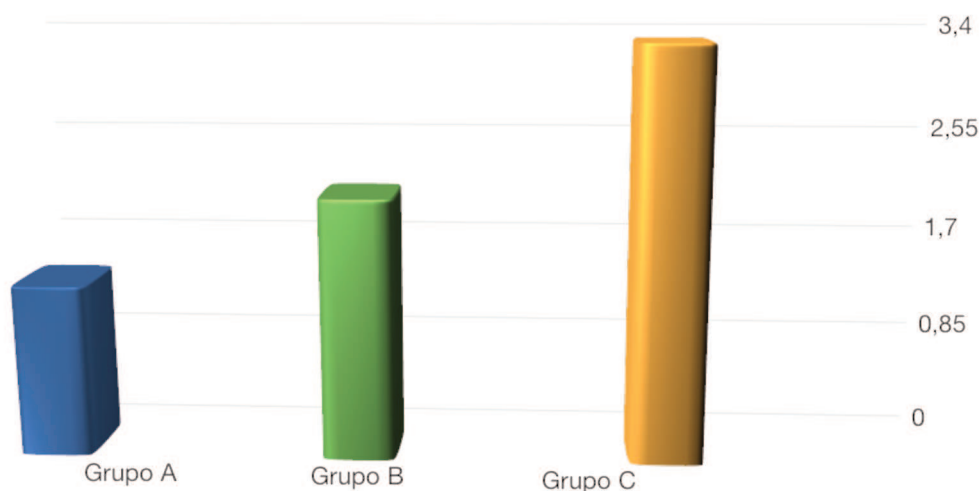


Tabela 15: Gráfico de barras de médias dos grupos de estudo

V. DISCUSSÃO

1. Pertinência do tema

Presentemente o tratamento do edentulismo baseia-se principalmente na reabilitação com implantes dentários. Sendo fundamental a manutenção e biodisponibilidade óssea adequada de modo a que reabilitação, implanto-suportada, seja funcional e estética a longo prazo (Minamizato et al., 2017; Iocca et al., 2017; Milinkovic & Cordaro, 2014).

Este tipo de reabilitação oral tornou-se uma das opções de tratamento mais previsível. Naturalmente, a necessidade de evitar a perda óssea alveolar, leva ao interesse pelas técnicas de regeneração óssea (Minamizato et al., 2017; Koga et al., 2016).

Os substitutos ósseos têm sido intensivamente estudados e utilizados, nas técnicas de regeneração óssea, de forma a reconstruir e aumentar o volume ósseo. Existem atualmente quatro tipos de enxerto ósseo, que são eles o autógeno, alógeno, aloplástico e xenógeno. Sendo que a escolha de um destes biomateriais depende de aplicabilidade clínica e volume do defeito (Kim et al., 2013).

Apesar do osso autógeno ser considerado o “gold-standard”, devido às suas características osteoindutivas, osteocondutoras e osteogénicas inerentes, os mesmos apresentam limitações. Limitações estas que podem resultar em alta morbidade, alta taxa de reabsorção e alto custo para o doente (Kim et al., 2013).

Com o objetivo de colmatar as limitações dos enxertos acima referidos, tornou-se inevitável desenvolver um biomaterial de enxerto capaz de realizar o processo de regeneração óssea e concomitantemente superar as desvantagens destes (Minamizato et al., 2017).

A dentina tem atraído muita atenção e, portanto, tem sido alvo de diversos estudos devido ao seu potencial uso como biomaterial de enxerto para regeneração óssea, pois além de possuir um conteúdo mineral elevado, quando comparado com os restantes substitutos ósseos, possui uma alta semelhança com o osso alveolar tanto na sua composição como na sua estrutura (Canto-Diaz et al., 2018; Kim et al., 2013). Atualmente existem diversos métodos de processamento da matriz de dentina autógena, no entanto, existem escassas informações acerca do processamento adequado da matriz dentina a ser

usada como biomaterial de enxerto (Koga et al., 2016; Atiya et al., 2014; Tabatabaei et al., 2016).

Recentemente foram desenvolvidas técnicas de processamento que permitem a utilização da matriz de dentina, mineralizada e parcialmente desmineralizada, para enxerto imediatamente após a extração dentária. Além de estes métodos superarem limitações relacionadas com os restantes métodos descritos, permitem a sua aplicabilidade da matriz de dentina autógena 15 a 20 minutos após a extração dentária. Adicionalmente permite obter um particulado ausente de bactérias, vírus e toxinas pronto a ser utilizado como biomaterial de enxerto para regeneração óssea (Binderman et al., 2014; Calvo-Guirado et al., 2018; Koga et al., 2016).

2. Análise do estudo realizado

O objetivo deste trabalho de investigação foi comparar dois métodos de processamento da matriz de dentina autógena humana (mineralizada e parcialmente desmineralizada), relativamente à abertura dos túbulos dentinários. Esta foi triturada com o auxílio da máquina “Smart Dentin Grinder™” e tratada com uma solução alcoólica básica desinfetante (“cleanser”), com uma solução desmineralizante (EDTA) (exclusiva do grupo c – dentina parcialmente desmineralizada) e ainda com uma solução fosfatada tampão (PBS). As observações microscópicas foram realizadas com microscópio eletrónico de varrimento (SEM) e as medições dos diâmetros dos túbulos foram determinadas com o programa informático “ImageJ”.

Tal como no estudo de Williams et al. (2015) foi realizada a análise do diâmetro dos túbulos dentinários através do programa “ImageJ”, que consiste num método eficiente e pouco dispendioso para análise de imagens obtidas com recurso a microscopia eletrónica (SEM). O programa informático permitiu converter o resultado da abertura do diâmetro dos túbulos dentinários em dados numéricos, que podem ser facilmente estudados e replicados.

O uso da solução alcoólica “cleanser” teve como principal objetivo dissolver matéria e resíduos orgânicos dispostos à superfície do particulado, que simultaneamente promove a abertura dos túbulos dentinários. O etanol presente na solução afeta apenas compostos orgânicos presentes na superfície externa, pois não consegue transpor a superfície mineral externa e, portanto, não danifica o colagénio nem a matriz orgânica da dentina (Calvo-Guirado et al., 2018). A solução de EDTA a 10%, aplicada

exclusivamente ao grupo da dentina parcialmente desmineralizada, teve como finalidade aumentar o diâmetro dos túbulos dentinários por meio de ação desmineralizante. O aumento do diâmetro dos túbulos permite a libertação dos compostos da matriz dentinária que desempenham um papel importante na remodelação e formação óssea (Tabatabaei et al., 2016). A solução tampão (PBS) aplicada, no fim do processamento do particulado de dentina, permite interromper a ação química dos compostos bem como promover a manutenção do pH (Binderman et al., 2014).

No estudo de Binderman et al. (2014), foi observado com recurso a microscopia eletrónica, um particulado de dentina autógena mineralizada humana após o respetivo processamento. Porém, enquanto que no estudo do Binderman foi observado e analisado as partículas de dentina mineralizada, nesta investigação realizou-se a análise comparativa entre o resultado do processamento tanto do particulado de dentina autógena humana mineralizada como parcialmente desmineralizada.

Os resultados obtidos, decorrentes deste estudo de investigação, permitem afirmar que existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) entre o processamento da matriz de dentina autógena humana mineralizada ($2,123 \pm 0,303$) e parcialmente desmineralizada ($3,323 \pm 0,415$), no que toca à abertura do diâmetro dos túbulos dentinários. No entanto, era benéfico a realização de mais estudos “in-vitro” que permitissem contabilizar e definir, através de espectroscopia de raio X por dispersão em energia (EDS), qual o grau de desmineralização que as soluções, “cleanser” e EDTA a 10%, efetuam na matriz de dentina, consoante as dimensões do particulado, através da determinação das concentrações minerais antes e após processamento.

Verificou-se que o volume de partículas resultante do processo de trituração é cerca de 2 a 3 vezes superior ao volume original do dente, demonstrando resultados acordantes com estudo de Calvo-Guirado et al. (2018) onde o mesmo afirma que 0,25gr de dente humano originam, após trituração, 1.0cc de biomaterial.

Foi apurado um aumento do diâmetro dos túbulos dentinários, após o processamento do particulado de dentina autógena mineralizada numa solução alcoólica básica (“cleanser”), sendo os resultados acordantes com o estudo de Binderman et al. (2014). Este aumento é devido à presença de NaOH e álcool a 30% na composição da solução “cleanser”, que, além de atuar de forma a eliminar bactérias e vírus, dissolve matéria e resíduos orgânicos da superfície do particulado (Calvo-Guirado et al., 2018).

No entanto, esse aumento de diâmetro dos túbulos, foi maior após o processamento do particulado de dentina autógena humana numa solução

desmineralizante (dentina parcialmente desmineralizada), tal como ocorreu no estudo de Koga et al. (2016). A dentina parcialmente desmineralizada contém uma maior percentagem de fatores de crescimento, que aquando da realização da abertura dos túbulos através do processo de desmineralização, irá permitir a libertação destes. Sendo demonstrado no estudo de Koga et al. (2016), uma maior percentagem de formação óssea, no diz respeito à dentina parcialmente desmineralizada, quando comparada com a mineralizada (Koga et al., 2016).

Outro fator a ter em conta, acerca do processo de desmineralização, prende-se pelo facto de que o mesmo leva a dissolução do cálcio das superfícies das partículas, que por sua vez origina a formação de regiões porosas e rugosas que favorecem os processos de adesão e proliferação celular, das células osteoprogenitoras, essenciais na cascata de formação óssea (Khanijou et al., 2018).

O processo de trituração com a máquina "Smart Dentin Grinder™" permite obter e selecionar um particulado com um tamanho compreendido entre 300 a 1200µm o que é altamente benéfico para o sucesso da técnica. Pois, segundo o estudo de Koga et al. (2016), a formação de novo osso, nomeadamente com dimensões de partícula de tamanho compreendido entre 800 a 1200µm, é muito superior quando comparado a dimensões de partículas fora de este intervalo (Koga et al., 2016).

Eventualmente teria sido interessante, analisar como varia a média da abertura do diâmetro dos túbulos dentinários consoante o tempo de aplicação da solução desmineralizante (EDTA). Visto que, o mesmo fomenta à libertação dos fatores de crescimento da matriz orgânica da dentina que têm um papel direto na formação e remodelação óssea.

VI. Conclusão

Após a realização deste trabalho de investigação e formuladas as hipóteses, foi concluído que tanto a solução alcoólica básica desinfetante (“cleanser”) como a solução desmineralizante (EDTA), integrantes no protocolo de processamento do enxerto de matriz de dentina autógena humana, promovem a abertura dos túbulos dentinários. Contudo foi demonstrado, com diferenças estatisticamente significativas, que o tratamento do particulado de dentina autógena humana com a solução alcoólica básica desinfetante “cleanser” seguido da aplicação de EDTA a 10% (Grupo C - dentina parcialmente desmineralizada) permite a maior abertura dos túbulos dentinários.

Sendo assim a hipótese de estudo H1.1 foi comprovada, existindo diferenças estatisticamente significativas na abertura dos túbulos dentinários após imersão do particulado de dentina autógena numa solução alcoólica básica (dentina mineralizada) ou com aplicação de uma solução de EDTA a 10% (dentina parcialmente desmineralizada) após análise com recurso a microscopia eletrónica.

Podemos assim concluir que, a matriz de dentina parcialmente desmineralizada, devido ao tempo relativamente curto de preparação e às suas características inerentes, possa ser considerada como uma opção de tratamento viável no âmbito da regeneração óssea.

VII. Perspetivas futuras

Demonstra-se relevante a realização de mais estudos “in vivo” em animais e humanos randomizados, com um longo período de acompanhamento, de forma a averiguar e comparar os métodos de processamento da matriz dentina autógena, bem como determinar qual o verdadeiro impacto que, a aplicação de uma solução desmineralizante (EDTA), provoca no que toca a formação de novo osso, nomeadamente acerca da densidade, qualidade e quantidade obtida.

São também requeridos mais estudos humanos, a longo prazo, de forma a aferir a eficácia dos processamentos aplicados ao particulado de dentina autógena humana.

Surge também a necessidade da realização de mais estudos, em animais e em humanos, de forma a verificar qual a influência dos vários métodos de processamento da matriz de dentina, no que toca ao coeficiente de estabilidade implantar e a respetiva osteointegração e sobrevivência dos mesmos.

BIBLIOGRAFIA

Araújo, M. G., & Lindhe, J. (2009). Ridge alterations following tooth extraction with and without flap elevation: An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research*, 20(6), 545–549. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2008.01703>.

Arthur, A., Rychkov, G., Shi, S., Koblar, SA., & Gronthos, S. (2008). Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells*. 2008; 26:1787-95.

Atiya, B. K., & Abdulrazzak, S. (2014). Liquid Nitrogen-Treated Autogenous Dentin as Bone Substitute: An Experimental Study in a Rabbit Model. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014 Mar-Apr;29(2): e165-70. <https://doi: 10.11607/jomi.te54>.

Bessho, K., Tagawa, T., & Murata, M. (1990). Purification of Rabbit Bone Morphogenic Protein Derived From Bone, Dentin, and Wound Tissue After Tooth Extraction, *J Oral Maxillo'ac Surg* 48:162-169, 1990

Binderman, I., Hallel, G., Nardy, C., Yaffe, A., & Sapoznikov, L. (2014). A Novel Procedure to Process Extracted Teeth for Immediate Grafting of Autogenous Dentin. *Interdisciplinary Medicine and Dental Science*, 2(6), 2–6. <https://doi.org/10.4172/jimds.1000154>

Boskey, AL., Doty, SB., Kudryashov, V., Mayer-Kuckuk. P., Roy, R., & Binderman, I. (2008). Modulation of extracellular matrix protein phosphorylation alters mineralization in differentiating chick limb-bud mesenchymal cell micromass cultures. *Bone*. 2008 Jun;42(6):1061-71. <https://doi: 10.1016/j.bone.2008.01.016>

Butler, WT., Mikulski, A., & Urist, MR. (1977). Noncollagenous proteins of a rat dentin matrix possessing bone morphogenetic activity. *J Dent Res* (1977)., 56(3), 228-232.

Butler, WT., & Ritchie, H. (1995). The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol* 1995; 39: 169–179.

Calvo-Guirado, J., Val, J., Ramos-Oltra, M., Martínez, C., Ramírez-Fernández, M., Maiquez-Gosálvez, M., & Delgado-Ruiz, R. (2018). The Use of Tooth Particles as a

Biomaterial in Post-Extraction Sockets. Experimental Study in Dogs José. *Dentistry Journal*, 6(12). <https://doi.org/10.3390/dj6020012>

Calvo-Guirado, J., Montilla, A., De Aza, P., Fernández-Domínguez, M., Gehrke, S., Cegarra-Del Pino, P., Mahesh, L., Pelegrine, A., Aragonese, J., & Maté-Sánchez de Val, J. (2018). Particulated, Extracted Human Teeth Characterization by SEM–EDX Evaluation as a Biomaterial for Socket Preservation: An In Vitro Study. *Materials*. 2019, 12, 380; <https://doi.org/10.3390/ma12030380>

Chung, VH., Chen, AY., Kwan, CC., Chen, PK., & Chang, SC. (2011). Mandibular alveolar bony defect repair using bone morphogenetic protein 2-expressing autologous mesenchymal stem cells. *J Craniofac Surg*. 2011 Mar;22(2):450-4. <https://doi.org/10.1097/SCS.0b013e3182077de9>.

Cox, CF., White, KC., Ramus, DL., Farmer, JB., & Milner Snuggs, H. (1992). Reparative dentin: factors affecting its deposition. *Quintessence Int* 1992; 23: 257–270.

de Gorter, DJ., van Dinther, M., Korchynskyi, O., & ten Dijke, P. (2011). Biphasic effects of transforming growth factor b on bone morphogenetic protein-induced osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 2011; 26: 1178–1187.

Goldberg, M. (2011). Dentin structure composition and mineralization. *Frontiers in Bioscience*, E3(2), 281. <https://doi.org/10.2741/e281>

Gomes, M. F., Abreu, P. P. De, Rose, A., Morosolli, C., Araújo, M. M., & Vilela, G. (2006). Densitometric analysis of the autogenous demineralized dentin matrix on the dental socket wound healing process in humans. *Braz Oral Res*. 2006 Oct-Dec;20(4):324-30.

Heldin, CH., Ostman, A., & Ronnstrand, L. (1998). Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1378: F79–F113.

Huggins, B. Y. C., Wiseman, S. O. L., Reddi, A. H., & Ph, D. (1970). Transformation of fibroblasts by allogenic and xenogeneic transplants of demineralized tooth and bone. *J Exp Med*. 1970 Dec 1;132(6):1250-8.

Iocca, O., Farcomeni, A., Pardiñas Lopez, S., & Talib, H. S. (2017). Alveolar ridge preservation after tooth extraction: a Bayesian Network meta-analysis of grafting materials efficacy on prevention of bone height and width reduction. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(1), 104–114. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12633>

Kassolis, JD., Rosen, PS., & Reynolds, MA. (2000). Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *J Periodontol* 2000; 71: 1654–1661.

Kawada, K., Upadhyay, G., Ferandon, S., Janarthanan, S., Hall, M., Vilardaga, JP., & Yajnik, V. (2009). Cell migration is regulated by platelet-derived growth factor receptor endocytosis. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 4508–4518.

Kawasaki K, Buchanan AV, Weiss KM. (2007). Gene Duplication and the Evolution of Vertebrate Skeletal Mineralization. *Cells Tissues Organs*. 2007; 186:7–24.

Kerebel, B., Le Cabellec, M-T., Daculsi, G., & Kerebel, L-M. (1978). Osteodentine and vascular osteodentine of *Anarhichas lupus* (L.). *Cell Tiss Research*. 1978; 187:135–146.

Khanijou, M., Seriwatanachai, D., Boonsiriseth, K., Suphangul, S., Pairuchvej, V., Srisatjaluk, R., & Wongsirichat, N. (2018). Bone graft material derived from extracted tooth: A review literature. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology*, 31 (2019) 1–7 (July). <https://doi.org/10.1016/j.ajoms.2018.07.004>

Kim, Y-K., Yun, P-Y., Um, I-W., Lee, H-J., Yi, Y-J., Bae, J-H., & Lee, J. (2014). Alveolar ridge preservation of an extraction socket using autogenous tooth bone graft material for implant site development: prospective case series. *The Journal of Advanced Prosthodontics* 2014; 6:521-7. <http://dx.doi.org/10.4047/jap.2014.6.6.521>

Kim, E.-S. (2015). Autogenous fresh demineralized tooth graft prepared at chairside for dental implant. *Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery*, 37(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s40902-015-0009-1>

Kim, E.-S., Lee, I.-K., Kang, J.-Y., & Lee, E.-Y. (2015). Various autogenous fresh demineralized tooth forms for alveolar socket preservation in anterior tooth extraction sites: a series of 4 cases. *Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery*, 37(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s40902-015-0026-0>

Kim, Y.-K., Lee, J., Um, I.-W., Kim, K.-W., Murata, M., Akazawa, T., & Mitsugi, M. (2013). Tooth-derived bone graft material. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 39(3), 103. <https://doi.org/10.5125/jkaoms.2013.39.3.103>

Kim, Y., & Choi, Y. (2011). Tooth Autotransplantation with Autogenous Tooth-Bone Graft: A Case Report. *J Kor Dent Sci*. 2011; 4(2): 79 – 84 <http://dx.doi.org/10.5856/JKDS.2011.4.2.79>

Kim, Y. K., Kim, S. G., Byeon, J. H., Lee, H. J., Um, I. U., Lim, S. C., & Kim, S. Y. (2010). Development of a novel bone grafting material using autogenous teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 109(4), 496–503. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.10.017>

Kim, Y. K., Kim, S. G., Yun, P. Y., Yeo, I. S., Jin, S. C., Oh, J. S., & Kim, G. W. (2014). Autogenous teeth used for bone grafting: A comparison with traditional grafting materials. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 117(1), e39–e45. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2012.04.018>

Kim, Y., Lee, J., & Um, I. (2015). Guided Bone Regeneration Using Demineralized Dentin Matrix: Long-Term Follow-Up. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, (December), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2015.10.030>

Kim, Y., Pang, K., Yun, P., Leem, D., & Um, I. (2016). Long-term follow-up of autogenous tooth bone graft blocks with dental implants. *Clin Case Rep*. 2017 Jan 8;5(2):108-118. <https://doi.org/10.1002/ccr3.754>

Kinney, JH., Balooch, M., Marshall, SJ., Marshall, GW., & Jr Weihs, TP. (1996). Hardness and Young's modulus of human peritubular and intertubular dentine. *Arch Oral Biol* 1996; 41: 9–13.

Koga, T., Minamizato, T., Kawai, Y., Miura, K. I., Takashi, I., Nakatani, Y., & Asahina, I. (2016). Bone regeneration using dentin matrix depends on the degree of demineralization and particle size. *PLoS ONE*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147235>

Lesot H, Bégue-Kirn C, Kubler MD, Meyer JM, Smith AJ, Cassidy N, Ruch JV. (1993). Experimental induction of odontoblast differentiation and stimulation during reparative process. *Cells Materials* 1993; 3: 201– 207.

Li, G., Cui, Y., McIlmurray, L., Allen, WE., & Wang, H. (2005). RhBMP-2, rhVEGF(165), rhPTN and thrombin-related peptide, TP508 induce chemotaxis of human osteoblasts and microvascular endothelial cells. *J Orthop Res* 2005; 23: 680–685.

Lin, GL., & Hankenson, KD. (2011). Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 2011; 112: 3491–3501.

Magloire, H., Bouvier, M., & Joffre, A. (1992). Odontoblast response under carious lesions. *Proc Finn Dent Soc* 1992; 88(Suppl I): 257–274.

Mazzoni, A., Breschi, L., Carrilho, M., Nascimento, F., Orsini, G., Ruggeri JR, A., Gobbi, P., Manzoli, L., Tay, F., Pashley, D., & Tjäderhane, L. (2012). A review of the nature, role, and function of dentin non-collagenous proteins. Part 2: enzymes, serum proteins, and growth factors. *Endodontic Topics*, (3), 19-40. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2012.00268.x>

Milinkovic, I., & Cordaro, L. (2014). Are there specific indications for the different alveolar bone augmentation procedures for implant placement? A systematic review. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 43(5), 606–625. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2013.12.004>

Minamizato, T., Koga, T., Takashi, I., Nakatani, Y., Umebayashi, M., Sumita, Y., & Ikeda, T. (2017). Clinical application of autogenous partially demineralized dentin matrix prepared immediately after extraction for alveolar bone regeneration in implant dentistry: a pilot study. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, 2018 Jan;47(1):125-132. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2017.02.1279>

Moharamzadeh, K., Freeman, C., & Blackwood, K. (2008). Processed bovine dentine as a bone substitute. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2008;46: 110–113.

Orsini, G., Ruggeri JR, A., Mazzoni, A., Nato, F., Mazoli, L., Putignano, A., Di Lenarda, R., Tjäderhane, L., & Breschi, L. (2012). A review of the nature, role, and function of dentin non-collagenous proteins. Part 1: proteoglycans and glycoproteins. *Endodontic Topics*, (3), 1–18.

Oryan, A., Alidadi, S., Moshiri, A., & Maffulli, N. (2015). Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions TL - 9. *Journal of Orthopedic Surgery and Research*, 9 VN-re, 1–27. <https://doi.org/10.1186/1749-799X-9-18>

Pang, K. M., Um, I. W., Kim, Y. K., Woo, J. M., Kim, S. M., & Lee, J. H. (2017). Autogenous demineralized dentin matrix from extracted tooth for the augmentation of alveolar bone defect: a prospective randomized clinical trial in comparison with anorganic bovine bone. *Clinical Oral Implants Research*, 28(7), 809–815. <https://doi.org/10.1111/clr.12885>

Papagerakis, P., Berdal, A., Mesbah, M., Peuchmaur, M., Malaval, L., & Nydegger J. (2002). Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. *Bone* 2002; 30:377–85.

Qin, C., Baba, O., & Butler, WT. (2004). Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15:126–36.

Ravidran, S., & George, A. (2015). Dentin Matrix Proteins in Bone Tissue Engineering. *Adv Exp Med Biol*. 2015; 881: 129–142. doi:10.1007/978-3-319-22345-2_8.

Reis-Filho, C., Silva, E., Martins, A., Pessoa, F., Gomes, P., Araújo, M., Miziara, M., & Alves, J. (2011). Demineralised human dentine matrix stimulates the expression of VEGF and accelerates the bone repair in tooth sockets of rats. *Archives of oral biology*, 57 (2012); 469–476.

Ritchie, HH., Pinero, GJ., Hou, H., & Butler, WT. (1995). Molecular analysis of rat dentin sialoprotein. *Connect Tissue Res* 1995; 33:73–9.

Smith, A. J., Scheven, B. A., Takahashi, Y., Ferracane, J. L., Shelton, R. M., & Cooper, P. R. (2012). Dentine as a bioactive extracellular matrix. *Archives of Oral Biology*, 57(2), 109–121. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.07.008>

Smith, A., & Leaver, A. (1979). Non-collagenous components of the organic matrix of rabbit incisor dentine. *Arch Oral Biol* 1979; 24:449–454.

Smith, P. C., Martínez, C., Cáceres, M., & Martínez, J. (2015). Research on growth factors in periodontology. *Periodontology* 2000, 67(1), 234–250. <https://doi.org/10.1111/prd.12068>

Sodek, J., & Mandell, SM. (1982). Collagen metabolism in rat incisor predentine *in vivo*: synthesis and maturation of type I, alpha 1 (I) trimer, and type V collagens. *Biochemistry* 1982; 21: 2011–2015.

Stevens, A., Zuliani, T., Olejnik, C., LeRoy, H., Obriot, H., & Kerr-Conte, J. (2008). Human dental pulp stem cells differentiate into neural crest-derived melanocytes and have label-retaining and sphere-forming abilities. *Stem Cells Dev* 2008; 17:1175-84.

Tabatabaei, F. S., Tatari, S., Samadi, R., & Moharamzadeh, K. (2016). Different methods of dentin processing for application in bone tissue engineering: A systematic review. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 104(10), 2616–2627. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35790>

Takuma S, Yanagisawa T, Lin WL. (1977). Ultrastructural and microanalytical aspects of developing osteodentin in rat incisors. *Calcif Tissue Res*. 1977; 29:215–222.

Tang, D., Tare, R. S., Yang, L. Y., Williams, D. F., Ou, K. L., & Oreffo, R. O. C. (2016). Biofabrication of bone tissue: Approaches, challenges and translation for bone regeneration. *J Biomaterials*, 83, 363–382. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.024>

Tjäderhane, L., Carrilho, M. R., Breschi, L., Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2012). Dentin basic structure and composition-an overview. *Endodontic Topics*, 20(1), 3–29. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2012.00269.x>

Tomson, PL., Grover, LM., Lumley, PJ., Sloan, AJ., Smith, AJ., & Cooper, PR. (2007). Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *J Dent* 2007; 35:636–642.

Toyosawa, S., Okabayashi, K., Komori, T., & Ijuhin, N. (2004). mRNA expression and protein localization of dentin matrix protein 1 during dental root formation. *Bone* 2004; 34:124– 33. Urist, MR. (1965). Bone: Formation by autoinduction. *J Science* 150:893, 1965


Williams, C., Wu, Y., & Bowers, D. (2015). ImageJ analysis of dentin tubule distribution in human teeth. *Tissue and Cell*, 47 (2015) 343–348 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tice.2015.05.004> 0040-8166

Yoshida, T., Vivatbutsiri, P., Morriss-Kay, G., Saga, Y., & Iseki, S. (2008). Cell lineage in mammalian craniofacial mesenchyme. *Mech Dev* 2008; 125:797-808.

Young-Kyun Kim, Jeong Keun Lee, Kyung-Wook Kim, I.-W. U. and M. M. (2013). Healing Mechanism and Clinical Application of Autogenous Tooth Bone Graft Material. *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications Materials*. 2013; 39:103-111. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/53200>

Anexos

1.



Clínica Dentária Universitária

**Declaração da Direção Clínica para cedência de dentes
do BDH para realização trabalho de projeto final do
MIMD**

IDENTIFICAÇÃO DO ESTUDANTE: João Carlos Tavares Abrantes trindade

TÍTULO DO TRABALHO: Comparação da abertura dos túbulos dentinários de um particulado de dentina humana mineralizada e parcialmente desmineralizada com recurso a microscopia eletrónica – estudo piloto experimental "in vitro"

Excelentíssima Professora Doutora Fernanda de Mesquita


O/A aluno/a João Carlos Tavares Abrantes Trindade pode utilizar dentes molares hígidos do Banco de dentes humanos (BDH) da Clínica Dentária Universitária Egas Moniz (CDUEM).

Aguardo a aprovação da Comissão Científica e da Comissão de Ética, para cedência dos dentes.
Esta autorização aplica-se somente aos dentes que tenham sido efectivamente doados ao BDH, respeitando todo o circuito aprovado e certificado pela Certificação da Qualidade da Egas Moniz.

Atenciosamente, com os melhores cumprimentos

Monte da Caparica, 4 de Fevereiro de 2019

Direção Clínica



2.

Comissão de Ética



Proc. Interno nº 703

Ex.mo Senhor

João Carlos Tavares Abrantes Trindade


Monte de Caparica, 13 de fevereiro de 2019.

Ex.mo Senhor,

Em resposta ao Pedido de Parecer que submeteu à apreciação da Comissão de Ética da Egas Moniz, com o tema denominado **“Comparação da abertura dos túbulos dentinários de um particulado de dentina humana mineralizada e parcialmente desmineralizada com recurso a microscopia eletrónica – estudo piloto experimental in vitro”**, foi aprovado por unanimidade.

Com os melhores cumprimentos,

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz


Profª. Doutora Maria Fernanda de Mesquita

EGAS MONIZ – COOPERATIVA DE ENSINO SUPERIOR, CRL
Campus Universitário – Quinta da Granja – Monte de Caparica
2829-511 Caparica

3. Base de dados Grupo A (Controlo)

Diámetro dos Tubos Dentários do Grupo C (µm)																			
n 1	n 2	n 3	n 4	n 5	n 6	n 7	n 8	n 9	n 10	n 11	n 12	n 13	n 14	n 15	n 16	n 17	n 18	n 19	n 20
3,291	5,084	3,847	2,801	3,763	2,567	2,051	2,944	3,593	2,705	3,105	6,297	4,835	3,307	3,364	3,815	2,444	2,976	3,911	3,827
3,846	4,464	3,087	2,341	3,893	3,031	2,773	3,189	2,781	2,945	4,492	5,132	3,899	2,414	3,339	3,914	4,236	3,108	5,423	4,851
3,446	3,387	2,882	2,184	2,557	2,422	3,108	3,323	3,909	3,054	2,936	4,174	5,019	2,792	3,765	3,967	3,740	2,998	2,674	2,618
3,502	2,845	2,186	2,317	6,265	2,407	3,679	3,227	3,052	2,782	3,916	3,015	2,506	2,691	3,395	3,457	3,162	3,008	3,349	2,977
2,664	3,398	4,000	2,059	3,469	2,701	4,415	3,364	2,619	2,659	2,877	4,103	4,222	2,674	2,470	4,042	4,222	3,382	3,223	3,130
2,718	2,951	3,309	2,509	4,604	3,530	3,752	3,324	3,146	2,628	2,953	2,959	3,386	3,399	2,937	4,492	4,132	3,474	3,165	4,004
3,582	4,179	2,832	1,948	4,127	3,924	4,132	3,839	3,076	2,444	2,305	3,223	3,881	3,389	2,760	4,887	4,024	3,474	2,684	3,162
3,853	2,635	3,351	1,924	3,061	3,108	4,020	3,703	3,105	2,455	2,328	4,241	3,841	2,745	3,049	4,138	3,359	3,047	3,191	3,723
2,842	3,738	3,947	2,125	3,883	2,341	3,925	3,145	2,832	2,621	2,175	3,924	3,212	3,860	3,049	3,731	3,579	3,093	2,745	3,299
3,932	2,635	3,087	2,142	4,508	2,231	3,277	2,845	3,439	3,012	2,971	3,450	4,602	2,782	3,602	3,507	4,087	2,992	3,705	2,745
3,614	3,101	2,426	2,886	3,122	2,317	3,211	3,016	3,284	3,143	2,981	2,436	4,031	2,882	3,049	3,962	4,236	3,137	3,302	3,130
3,099	2,938	3,309	2,817	5,851	2,642	4,302	3,538	3,581	2,627	2,261	3,152	5,596	3,074	3,211	3,593	3,837	2,897	3,354	2,782
3,646	3,094	2,850	2,892	3,265	3,615	3,345	3,090	3,644	2,611	2,307	3,747	3,676	3,747	3,084	3,105	4,132	4,091	2,765	2,576
2,248	3,300	3,067	2,556	3,872	2,792	3,409	2,965	3,509	2,601	1,946	4,117	4,206	3,357	2,760	3,632	4,447	2,646	2,983	3,348
3,013	2,923	3,534	2,701	4,489	4,018	3,511	2,688	4,318	2,529	2,221	3,464	3,947	2,684	2,594	4,058	3,590	3,001	2,712	3,663
2,441	3,047	3,397	2,301	6,110	2,971	3,477	3,016	3,243	2,473	2,403	4,559	3,822	2,500	3,331	3,293	4,376	3,216	2,973	3,130
3,898	2,907	3,031	1,962	2,892	2,041	2,984	3,441	2,650	2,467	3,095	3,336	3,289	2,598	3,180	3,834	5,116	2,646	3,960	2,983
3,208	2,564	2,711	1,830	3,310	2,509	2,892	4,372	3,499	2,533	3,381	3,712	3,711	2,301	2,461	4,284	4,637	4,227	2,990	2,796
3,440	1,928	2,499	2,628	3,883	2,701	3,661	4,098	3,654	2,850	2,887	3,738	3,111	2,742	2,946	3,198	3,038	3,874	2,414	3,265
3,500	3,342	3,853	2,501	3,899	1,742	3,275	3,247	2,995	2,784	2,946	3,555	3,346	2,500	3,507	3,779	3,339	3,319	3,885	3,145
3,721	3,398	2,413	2,252	5,918	2,125	2,589	2,944	3,590	2,312	2,931	3,992	3,822	2,340	2,991	3,740	5,103	3,276	2,801	3,464
3,654	3,540	3,540	3,116	1,769	3,795	3,713	3,356	3,114	2,239	2,334	3,041	3,929	2,224	2,845	4,524	4,441	3,818	2,977	3,400
3,047	3,087	3,367	2,325	2,738	2,860	3,293	2,947	3,206	2,666	2,991	3,130	3,445	2,782	3,457	4,586	4,776	3,482	2,728	2,604
3,343	3,343	2,693	3,346	4,764	3,156	3,346	3,244	3,079	3,072	2,566	4,914	4,412	2,728	2,328	4,594	4,533	2,885	2,745	2,792
3,398	2,757	3,278	5,333	5,306	2,509	3,485	3,302	3,076	3,045	2,856	1,836	2,514	3,970	2,698	5,182	3,234	3,980	3,422	3,723
4,982	3,728	2,744	4,662	4,207	2,943	3,368	3,396	3,632	2,628	2,856	3,594	3,755	3,651	2,867	4,287	3,472	3,227	4,743	3,010
3,398	3,398	3,798	6,450	3,925	3,079	3,401	3,113	3,331	2,677	1,843	2,679	3,591	3,631	3,217	5,315	4,791	2,913	2,795	3,335
3,041	2,923	3,516	6,895	3,475	3,234	3,300	3,664	3,016	2,972	1,588	2,505	3,947	2,796	2,812	4,205	5,082	3,517	3,282	3,074
3,870	5,088	2,499	5,344	4,086	2,498	3,498	3,544	2,836	2,628	2,174	3,585	5,746	3,346	3,193	4,578	3,234	3,108	3,682	3,941
3,403	2,757	3,259	3,787	3,322	2,721	3,245	3,627	3,507	2,911	2,096	2,851	4,400	2,851	2,005	4,277	3,299	2,840	3,457	3,590
3,578	3,470	4,044	4,459	3,322	2,567	2,892	3,567	3,102	2,755	2,034	3,198	3,872	3,081	2,449	9,238	4,031	3,629	2,860	3,750
3,389	3,982	2,508	3,398	3,724	2,683	3,676	3,091	3,798	2,503	2,792	3,127	3,324	3,728	3,311	5,050	3,177	3,569	3,279	3,688
3,162	3,592	2,973	4,466	3,812	4,154	3,469	3,099	2,845	2,947	2,996	3,316	3,924	3,307	3,002	4,214	3,960	2,589	4,341	3,535
3,246	3,654	3,309	5,882	3,487	3,872	2,407	3,315	2,898	2,259	2,952	2,824	3,947	2,901	2,566	4,003	4,476	3,017	3,130	2,608
3,671	3,300	4,446	3,452	3,877	3,166	2,999	3,064	3,105	1,858	2,777	2,844	3,815	3,547	2,460	4,773	3,701	2,899	3,692	3,145
2,716	2,823	3,364	5,679	4,102	3,537	3,409	3,722	2,619	1,489	2,805	3,091	4,018	2,964	2,775	3,248	3,303	3,469	3,047	2,560
3,389	2,968	4,446	5,274	3,873	2,194	2,434	3,227	3,730	2,112	2,443	2,855	3,870	3,204	2,461	4,233	3,856	2,897	2,500	3,153
3,246	2,672	3,264	3,671	2,864	4,199	3,321	3,334	3,599	1,605	3,104	3,415	4,701	2,730	2,018	5,136	4,070	3,146	2,702	2,745
3,974	4,720	4,984	4,478	3,564	3,227	3,409	3,815	3,240	2,791	2,258	3,648	3,419	3,037	2,732	3,137	3,688	2,889	3,767	3,310
3,598	3,738	4,066	4,882	3,068	3,847	3,404	4,135	3,439	2,511	2,221	2,602	3,189	4,682	2,501	4,233	4,557	3,352	2,533	3,177
3,936	4,333	3,161	4,446	3,469	4,113	3,401	3,703	3,031	3,001	1,941	2,917	3,747	3,189	2,849	3,619	4,387	3,327	2,876	3,389
3,654	3,899	2,882	4,478	3,487	2,883	3,485	4,213	4,102	2,905	2,118	2,712	4,209	3,204	2,135	4,087	3,121	3,393	3,779	3,118
4,104	4,699	2,684	5,084	5,162	3,537	3,795	3,396	3,757	2,628	2,118	2,712	4,209	3,346	2,393	3,629	3,856	3,114	3,457	3,186
3,246	3,654	3,303	3,899	3,227	2,694	3,291	3,334	3,834	2,407	2,273	2,719	4,136	3,111	2,459	2,887	3,259	3,418	3,223	3,671
3,388	4,376	3,550	5,679	3,763	2,912	2,931	3,666	3,439	2,845	2,624	2,806	3,440	3,223	2,592	4,767	3,457	2,848	2,995	3,010
4,972	3,250	2,902	4,515	4,305	3,129	3,369	2,497	3,575	2,129	2,339	3,106	4,309	3,155	2,566	3,302	3,276	2,646	3,059	4,007
3,856	3,470	2,455	2,845	3,088	3,297	2,835	3,782	3,763	2,338	2,644	2,518	2,951	2,582	2,321	3,817	3,095	2,688	2,712	3,579
3,746	3,687	2,235	2,230	3,168	2,748	3,490	3,612	3,340	2,566	2,747	3,392	3,013	2,682	2,956	3,404	3,582	3,137	3,265	2,144
3,991	3,067	3,323	2,581	2,459	2,981	2,457	3,291	3,614	2,716	3,113	3,100	3,540	2,436	2,991	3,800	3,369	2,917	3,001	2,973
3,603	3,838	3,726	3,873	3,102	3,291	2,671	3,396	3,834	2,196	3,159	2,712	3,147	3,299	3,033	4,010	3,799	2,891	2,664	4,206

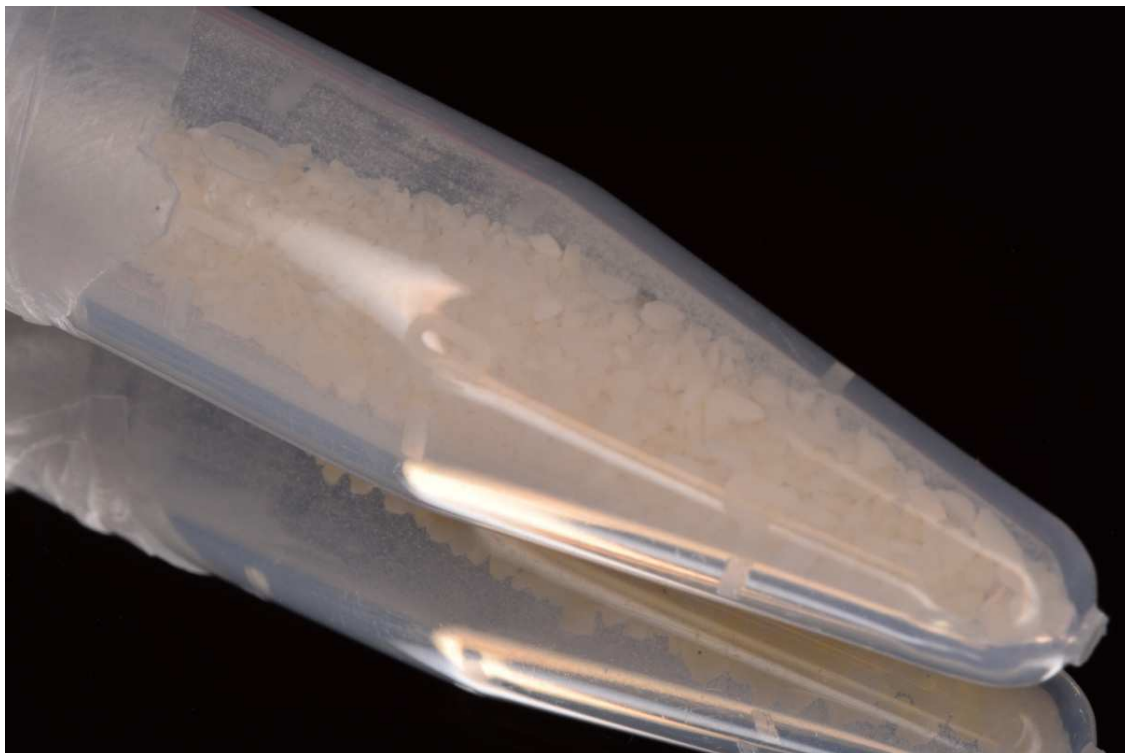
4. Base de dados Grupo B (matriz de dentina mineralizada)

Diâmetro dos Tubulos Dentinários do Grupo B (µm)																			
n 1	n 2	n 3	n 4	n 5	n 6	n 7	n 8	n 9	n 10	n 11	n 12	n 13	n 14	n 15	n 16	n 17	n 18	n 19	n 20
2.741	1.895	2.087	2.324	2.045	1.564	0.983	1.990	3.125	2.202	2.843	2.775	2.678	2.115	2.307	1.901	2.894	2.869	2.854	2.319
2.364	2.168	1.723	2.012	2.375	2.012	1.078	1.736	2.582	1.729	2.194	2.915	3.083	1.541	2.319	3.299	3.101	1.768	2.582	2.514
1.495	1.534	2.549	2.193	2.824	1.038	1.455	1.776	1.548	2.534	2.498	2.893	3.121	1.997	2.514	2.799	2.495	2.228	2.207	2.318
2.012	2.132	2.294	1.980	2.482	1.420	1.450	1.981	1.384	1.812	2.501	1.948	1.988	1.904	2.318	2.799	1.795	1.933	2.319	3.161
2.066	1.816	2.180	1.266	1.923	1.737	0.950	1.457	2.854	2.445	2.056	2.945	1.979	2.176	3.161	1.940	2.006	2.433	2.314	2.443
1.841	1.948	1.339	1.913	1.842	2.114	1.816	1.816	2.582	2.535	2.194	2.889	2.945	2.223	2.318	2.782	3.005	2.410	2.318	2.582
2.183	1.895	1.904	2.003	2.148	1.904	1.420	1.784	1.861	1.929	2.281	2.098	2.238	2.208	3.161	2.507	2.107	2.443	2.495	2.579
1.952	1.807	1.834	1.586	2.068	1.437	1.741	1.555	1.778	1.741	2.007	2.207	2.408	2.176	2.443	2.474	2.307	2.214	2.445	2.611
2.002	1.724	2.076	2.385	1.635	1.263	1.688	1.616	2.924	1.985	2.553	2.955	2.969	1.635	2.562	2.192	2.559	2.448	2.535	2.715
1.952	2.016	2.184	2.122	2.475	1.414	1.738	1.294	3.095	2.534	2.860	1.889	2.967	2.178	2.579	2.177	2.447	2.891	2.952	3.529
2.078	1.366	2.178	2.087	1.541	2.030	1.609	1.355	2.989	1.832	1.982	2.181	3.047	2.191	2.611	2.528	2.443	2.443	1.741	2.715
1.844	1.455	2.003	1.997	1.813	1.495	1.458	1.414	2.611	2.621	2.130	1.828	2.261	2.115	1.900	2.449	1.843	3.312	1.985	2.514
2.018	1.897	1.541	2.268	1.803	1.704	1.297	1.921	2.207	2.262	2.755	2.038	2.539	2.140	2.495	2.311	1.900	2.231	2.534	2.318
2.642	1.897	1.720	2.124	1.904	1.769	1.353	1.854	2.319	2.375	2.924	2.934	2.229	2.068	2.172	2.124	2.495	2.804	1.832	3.161
1.895	1.981	2.223	1.904	1.842	1.705	1.642	1.705	2.514	2.172	2.123	1.752	2.799	2.257	2.824	3.204	2.172	2.734	2.321	2.318
1.778	1.805	2.184	2.085	2.085	1.419	1.570	1.736	2.318	1.902	1.668	1.958	2.287	2.545	2.318	2.647	2.824	1.768	2.262	3.161
1.292	2.076	2.046	1.995	2.550	1.250	1.506	1.406	3.101	2.292	2.968	1.887	2.238	2.178	3.101	2.293	2.887	2.214	2.375	2.443
1.342	1.914	2.149	1.723	1.997	1.842	1.841	1.355	2.443	1.991	2.916	1.848	2.266	2.252	2.443	2.194	2.826	3.559	2.172	2.582
1.427	1.686	2.068	2.178	2.183	1.086	1.650	1.940	2.582	1.722	2.112	2.125	2.879	2.103	2.582	2.676	1.943	2.180	2.319	2.579
1.413	1.944	2.397	1.673	2.070	1.677	1.626	1.609	2.979	2.089	2.994	1.932	2.815	2.908	2.979	2.552	2.611	2.804	2.514	2.611
1.679	1.988	2.545	1.544	2.087	1.501	1.570	2.304	2.611	2.081	2.502	2.165	2.294	1.723	1.558	2.067	2.207	3.104	2.318	1.900
1.807	2.174	2.178	2.117	2.824	1.915	1.514	2.117	2.715	2.574	2.823	1.823	2.842	2.078	1.760	2.184	2.319	3.161	2.495	2.495
1.773	1.904	2.252	2.087	1.906	1.381	1.736	2.109	3.529	1.900	1.947	1.983	2.866	2.262	1.700	2.578	2.314	2.641	2.443	2.172
2.076	1.904	2.103	1.816	2.239	1.501	1.704	1.803	2.715	2.415	2.244	1.951	3.275	1.897	1.555	2.416	2.318	2.566	2.582	1.723
1.696	1.333	2.598	1.893	1.849	1.546	1.299	1.616	2.796	2.296	1.635	1.916	2.192	2.283	1.861	2.969	3.161	2.869	2.579	2.078
1.814	1.029	1.723	1.728	2.003	1.728	1.406	1.921	2.323	2.179	1.459	1.529	3.033	1.752	1.925	2.439	2.443	2.111	2.611	2.362
1.724	1.576	2.087	1.904	2.274	1.650	1.694	2.034	1.900	2.353	1.507	2.255	2.154	2.166	1.977	2.316	2.582	2.859	2.715	1.897
1.558	1.576	2.117	2.013	1.938	1.419	1.621	2.182	1.384	2.788	2.669	1.811	2.266	2.385	1.910	2.316	1.635	3.467	3.529	2.283
1.469	2.078	2.243	1.813	2.450	1.514	1.381	1.728	2.107	2.023	1.823	1.977	2.963	2.122	1.450	2.720	2.178	3.387	1.350	1.752
2.256	2.362	2.093	1.869	2.193	1.725	1.861	2.058	2.210	2.524	1.958	1.645	2.716	2.087	1.546	2.462	2.191	2.022	1.842	2.166
1.375	1.897	2.268	2.176	2.340	1.994	1.464	1.588	2.536	2.143	2.318	2.046	2.282	1.997	2.446	1.760	2.115	2.804	1.688	2.385
1.949	2.283	1.723	1.635	2.223	1.276	1.558	1.979	2.694	1.837	1.807	1.756	3.157	2.268	2.715	2.393	2.140	3.041	1.677	2.122
1.593	1.752	1.813	2.178	1.921	1.725	1.795	1.397	3.101	2.107	2.135	1.774	2.307	2.124	3.529	1.781	2.868	2.940	1.501	1.723
1.588	2.166	2.450	2.191	2.239	1.286	1.706	2.007	2.495	1.969	2.194	1.850	2.811	2.176	2.715	2.912	2.859	2.723	1.910	2.078
1.694	2.004	1.816	2.115	1.723	1.509	1.555	2.143	1.785	2.046	2.305	1.811	2.695	2.223	2.176	1.815	2.545	2.734	1.381	2.362
1.570	1.814	1.807	1.541	2.566	1.811	1.861	1.696	2.036	2.125	2.179	1.891	2.923	2.027	2.323	1.732	2.178	2.180	1.501	2.897
2.187	2.256	2.140	1.997	2.208	1.588	1.925	1.486	3.005	2.036	1.995	1.382	2.356	2.980	3.175	2.358	2.252	3.020	1.546	2.283
1.371	1.444	2.380	1.904	1.901	1.730	1.977	2.015	2.107	1.976	2.769	1.486	3.444	2.191	2.582	1.868	2.103	2.406	1.738	1.742
1.262	1.852	2.213	2.176	2.441	1.621	1.910	1.486	2.307	1.976	2.568	1.969	2.282	2.115	1.548	2.773	2.508	3.184	1.650	2.166
1.911	2.107	2.085	2.223	1.744	1.495	1.450	1.700	2.559	2.259	1.894	1.961	2.148	1.541	1.384	2.282	1.723	2.869	1.419	2.385
2.012	1.988	1.695	2.027	2.324	1.495	2.105	1.793	2.447	1.734	2.194	1.932	2.489	1.997	3.135	2.931	2.978	2.316	1.514	2.122
1.410	1.778	1.997	1.980	2.312	1.581	1.377	1.966	2.443	2.356	2.728	1.817	2.836	1.904	1.548	2.720	2.862	2.750	1.725	1.723
1.502	1.919	1.476	1.723	2.394	1.299	1.459	1.560	1.943	2.179	2.355	1.706	2.567	2.176	1.384	2.055	1.897	2.992	2.078	2.078
1.625	1.971	1.635	1.904	2.272	1.525	1.910	1.990	2.495	1.664	1.995	1.851	3.083	2.213	2.582	2.539	2.869	2.502	2.897	2.897
1.534	2.369	2.180	2.013	2.117	1.872	1.381	1.888	2.172	2.524	2.915	1.851	2.002	2.085	2.307	2.092	2.111	3.131	2.383	2.283
1.614	1.948	2.441	1.635	2.093	1.646	1.694	1.830	2.824	2.218	1.455	1.645	2.012	1.655	2.319	2.593	2.959	2.734	1.742	2.852
1.895	2.347	2.013	2.037	1.860	1.646	1.861	1.515	2.667	2.368	2.177	1.929	1.936	1.997	2.514	2.859	3.467	3.101	2.166	2.366
1.537	1.357	1.732	1.836	2.239	2.002	1.364	1.609	2.525	2.690	1.883	1.883	2.194	2.013	2.318	3.284	3.387	3.201	2.385	2.385
2.003	1.715	1.816	1.869	1.769	1.423	1.609	1.984	1.943	2.389	2.112	1.838	2.676	1.476	2.495	2.474	2.022	2.734	2.375	2.122

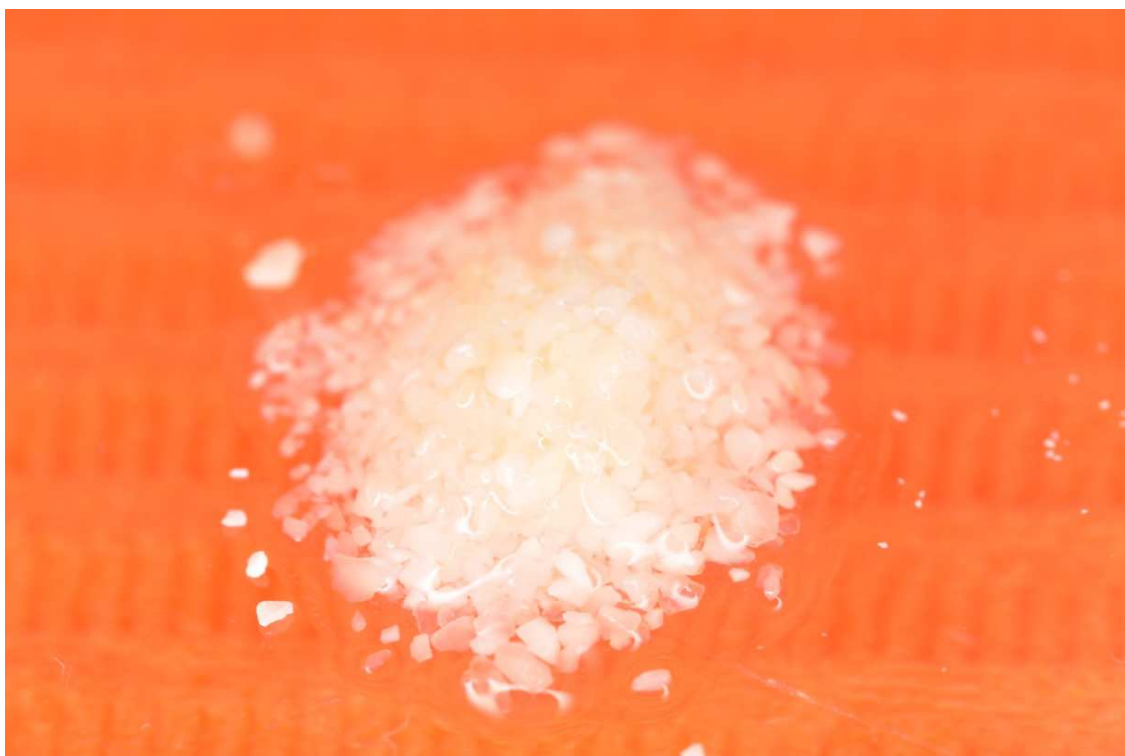
5.Base de dados Grupo C (matriz de dentina parcialmente desmineralizada)

Diâmetro dos Tubulos Dentinários do Grupo C (µm)																				
n 1	n 2	n 3	n 4	n 5	n 6	n 7	n 8	n 9	n 10	n 11	n 12	n 13	n 14	n 15	n 16	n 17	n 18	n 19	n 20	n 20
3.291	5.084	3.647	2.921	3.763	2.567	2.051	2.944	3.493	2.705	3.109	6.297	4.895	3.357	3.354	3.815	2.444	2.976	3.911	2.976	3.827
3.845	4.454	3.097	2.341	3.883	3.021	2.773	3.198	2.781	2.945	4.492	5.132	3.899	2.114	3.339	3.914	4.236	3.158	5.423	3.158	4.851
3.446	3.787	2.862	2.194	2.557	2.422	3.198	3.323	3.509	3.004	2.836	4.174	5.019	2.792	3.765	3.967	3.745	2.998	2.674	2.998	2.618
3.302	2.845	2.317	6.202	2.507	2.407	3.679	3.227	3.059	2.782	3.016	3.721	3.506	2.991	3.395	3.457	3.162	3.608	3.349	3.608	2.977
2.764	3.398	4.030	2.059	3.469	2.701	4.415	3.364	2.619	2.659	2.557	4.103	4.222	2.674	2.470	4.042	4.222	3.282	3.223	3.282	3.130
2.718	2.951	3.309	2.509	4.604	3.530	4.732	3.334	3.146	2.628	2.003	2.599	3.385	3.399	2.937	4.492	4.132	3.474	3.165	4.004	4.004
3.682	4.179	2.832	1.948	4.127	3.924	4.132	3.839	3.076	2.444	2.305	3.223	3.881	3.889	2.760	4.887	4.024	3.474	2.684	3.474	3.102
3.853	2.635	3.261	1.924	3.961	3.198	4.020	3.703	3.105	2.455	2.338	4.241	3.841	2.745	3.049	4.138	3.299	3.047	3.191	3.047	3.723
2.842	3.738	3.847	2.126	3.883	2.341	3.825	3.145	2.832	2.621	2.175	3.534	3.212	3.860	3.648	3.731	3.579	3.063	2.748	3.063	2.999
3.502	2.635	3.067	2.542	4.508	2.231	3.277	2.854	3.399	3.012	2.446	4.602	4.602	2.782	3.493	3.507	4.067	2.992	3.505	2.992	2.745
3.614	3.101	2.425	2.886	3.122	2.317	3.271	3.016	3.384	3.143	2.691	2.430	2.882	2.882	3.049	3.862	4.296	3.137	3.302	3.137	3.130
3.099	2.838	3.309	2.617	5.851	2.642	4.302	3.358	3.581	3.481	2.301	3.152	5.298	3.074	3.211	3.983	3.837	2.897	3.354	2.897	2.762
3.646	3.094	2.830	2.882	3.265	3.615	3.245	3.090	3.644	2.611	2.307	3.247	3.676	2.973	3.084	3.105	4.132	4.091	2.765	2.765	2.576
2.348	3.300	3.007	2.556	3.872	2.792	3.409	2.905	3.509	2.661	1.946	4.117	4.326	3.357	2.760	3.632	4.447	2.648	2.983	2.648	3.348
3.012	2.920	3.534	2.701	4.489	4.018	3.511	2.688	4.318	2.939	2.221	3.664	3.947	2.884	2.694	4.098	3.590	3.001	2.712	3.001	3.663
2.441	3.047	3.397	2.631	6.110	2.971	3.477	3.016	3.343	2.473	2.463	4.559	3.622	2.500	3.331	3.293	4.376	3.216	2.973	3.216	3.130
3.808	2.507	3.031	1.962	2.892	2.041	2.984	3.441	2.650	2.567	3.095	3.338	2.889	2.558	3.183	3.834	5.116	2.848	3.266	2.848	2.983
3.208	2.564	2.711	1.830	3.310	2.509	2.892	4.372	3.499	2.533	3.381	3.212	3.711	2.301	2.461	4.284	4.637	4.227	2.900	4.227	2.795
3.440	1.923	2.499	2.628	3.883	2.701	3.661	4.098	3.624	2.820	2.897	3.738	3.111	2.742	2.846	3.198	5.038	3.874	2.414	3.874	3.265
3.300	3.343	3.853	2.501	3.899	1.742	3.225	2.995	3.446	2.784	2.946	3.555	3.346	2.500	3.507	3.779	3.839	3.319	3.885	3.319	3.145
3.721	3.398	2.413	2.252	5.918	2.126	2.589	2.944	3.300	2.312	2.531	3.592	3.622	2.340	2.991	3.740	5.103	3.276	2.901	3.276	3.464
3.654	3.540	3.516	1.769	5.403	3.795	3.713	3.395	3.114	2.739	2.134	3.041	3.299	2.224	2.845	4.524	4.441	3.818	2.977	3.818	3.403
3.047	3.087	3.367	2.829	2.738	2.869	3.293	2.947	3.596	2.666	2.391	3.180	3.445	2.782	3.457	4.586	4.776	3.482	2.728	3.482	2.604
3.343	3.343	2.690	6.486	4.764	3.156	3.346	3.244	3.079	3.072	2.566	4.914	4.412	2.728	2.328	4.594	4.633	2.085	2.745	2.085	2.792
3.398	2.757	3.278	5.333	5.306	2.509	3.485	3.302	3.076	3.045	2.856	1.838	2.514	3.970	2.698	5.182	3.234	3.980	3.622	3.980	3.723
4.902	3.738	2.744	4.862	4.207	2.943	3.368	3.356	3.632	2.628	2.560	3.594	3.755	3.051	2.867	4.287	3.472	3.327	4.743	3.327	3.010
3.398	3.398	3.398	3.798	6.490	3.925	3.079	3.401	3.113	3.331	2.977	1.943	2.679	3.941	3.031	3.217	5.315	4.791	2.913	2.913	3.335
3.041	2.923	3.516	6.895	3.475	3.234	3.360	3.360	3.016	2.972	1.588	2.920	3.947	2.786	2.812	4.205	5.082	3.517	3.282	3.517	3.074
3.870	5.098	2.698	5.344	4.086	2.686	3.698	3.564	2.836	2.638	2.174	3.585	5.746	3.346	3.192	4.578	3.234	3.108	3.582	3.108	3.941
3.403	2.757	3.259	3.787	3.322	2.721	3.245	3.627	3.507	2.911	2.096	2.891	4.400	2.851	2.005	4.377	3.299	2.840	3.457	2.840	3.590
3.578	3.470	4.044	4.459	3.822	2.967	2.892	3.667	3.102	2.755	2.034	3.198	3.872	3.081	2.449	5.238	4.031	3.629	2.895	3.629	3.750
3.152	3.592	2.973	4.666	3.812	4.154	3.469	3.099	2.845	2.947	2.596	3.316	3.524	3.357	3.052	4.214	3.960	2.589	4.341	2.589	3.535
3.246	3.654	3.309	5.882	3.487	3.872	2.407	3.315	2.658	2.329	2.552	2.824	3.947	2.901	2.566	4.003	4.476	3.017	3.130	3.017	2.608
3.671	3.300	4.446	3.452	3.877	3.105	2.599	3.064	3.105	1.838	2.777	2.944	3.815	3.447	2.400	4.772	3.701	2.809	3.092	2.809	3.145
2.716	2.823	3.264	5.679	4.102	3.537	3.409	3.732	2.619	1.489	2.805	3.091	4.018	2.864	2.775	3.248	3.933	3.469	3.047	3.469	2.585
3.389	2.968	4.446	5.274	3.673	2.194	2.434	3.327	3.330	2.112	2.443	2.865	3.870	3.934	2.461	4.233	3.866	2.897	2.600	2.897	3.153
3.246	2.672	3.264	3.671	2.864	4.199	3.321	3.334	3.599	1.605	3.104	3.415	4.701	2.736	2.018	5.136	4.070	3.146	2.762	3.146	2.745
3.974	4.720	4.984	4.478	3.964	3.227	3.409	3.815	3.340	2.791	2.258	3.648	3.419	3.037	2.732	3.137	3.688	2.989	3.767	2.989	3.310
3.598	3.738	4.066	4.882	3.068	3.847	3.404	4.135	3.439	2.511	2.221	2.660	3.189	4.682	2.501	4.233	4.507	3.352	2.533	3.352	3.177
3.936	4.333	3.161	4.446	3.469	4.113	3.401	3.703	3.031	3.001	1.941	2.617	3.747	3.189	2.849	3.619	4.287	3.327	2.876	3.327	3.389
3.654	3.899	2.982	4.478	3.487	2.883	3.485	4.213	4.102	2.205	2.118	2.912	4.209	3.204	2.135	4.007	3.121	3.293	3.279	3.293	3.118
4.104	4.009	2.684	5.084	5.182	3.537	3.795	3.356	3.927	2.638	2.118	3.100	4.018	3.346	2.392	3.629	3.856	3.114	3.457	3.856	3.165
3.246	3.654	3.833	3.699	3.227	2.694	3.291	3.334	3.634	2.407	2.273	2.719	4.138	3.111	2.459	2.887	3.259	3.418	3.223	3.418	3.671
3.388	4.376	5.450	5.679	3.763	2.912	2.931	3.666	3.439	2.945	2.624	2.906	3.440	3.223	2.992	4.767	3.457	2.948	2.995	2.948	3.010
4.972	3.250	2.920	4.515	4.305	3.129	3.369	2.497	3.575	2.129	2.339	3.106	4.309	3.155	2.566	3.302	3.276	2.646	3.059	2.646	4.067
3.856	3.470	2.455	2.845	3.088	3.297	2.835	3.782	3.763	2.338	2.644	2.518	2.951	2.882	2.821	3.817	3.095	2.688	2.712	2.688	3.579
3.746	3.857	2.235	2.230	3.168	2.748	3.490	3.612	3.340	2.266	2.747	3.392	3.013	2.682	2.956	3.404	3.582	3.137	3.305	3.137	2.144
3.991	3.067	3.323	4.459	2.981	2.457	3.291	3.614	3.714	2.716	3.113	3.100	3.540	2.536	2.991	3.820	3.389	2.917	3.001	2.917	2.973
3.653	3.838	3.726	3.873	3.102	3.291	2.671	3.356	3.824	2.196	3.159	2.712	3.147	3.999	3.033	4.010	3.799	2.891	2.664	2.891	4.205

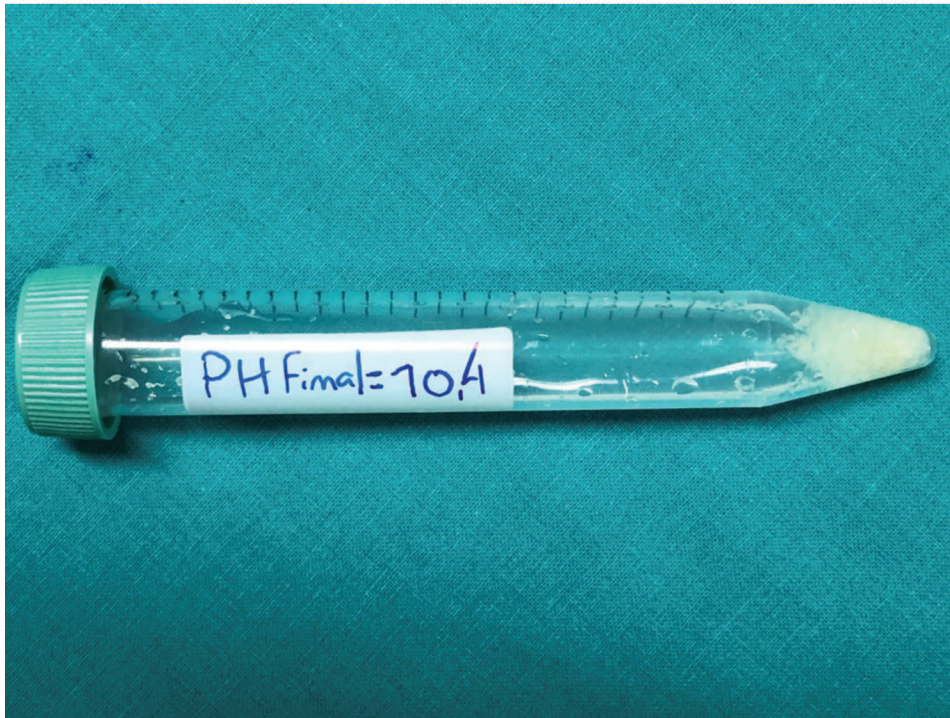
6. Particulado de dentina autógena humana em tubo *ependorf*



7. Particulado de dentina imerso em solução de EDTA a 10%



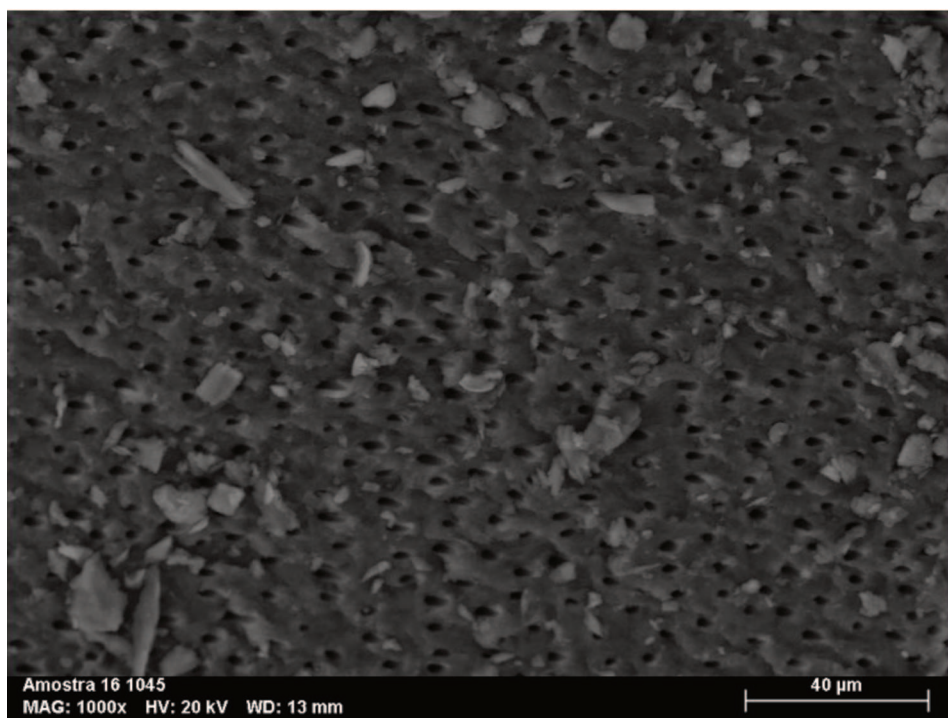
8. Ph final do particulado após processamento para dentina parcialmente desmineralizada



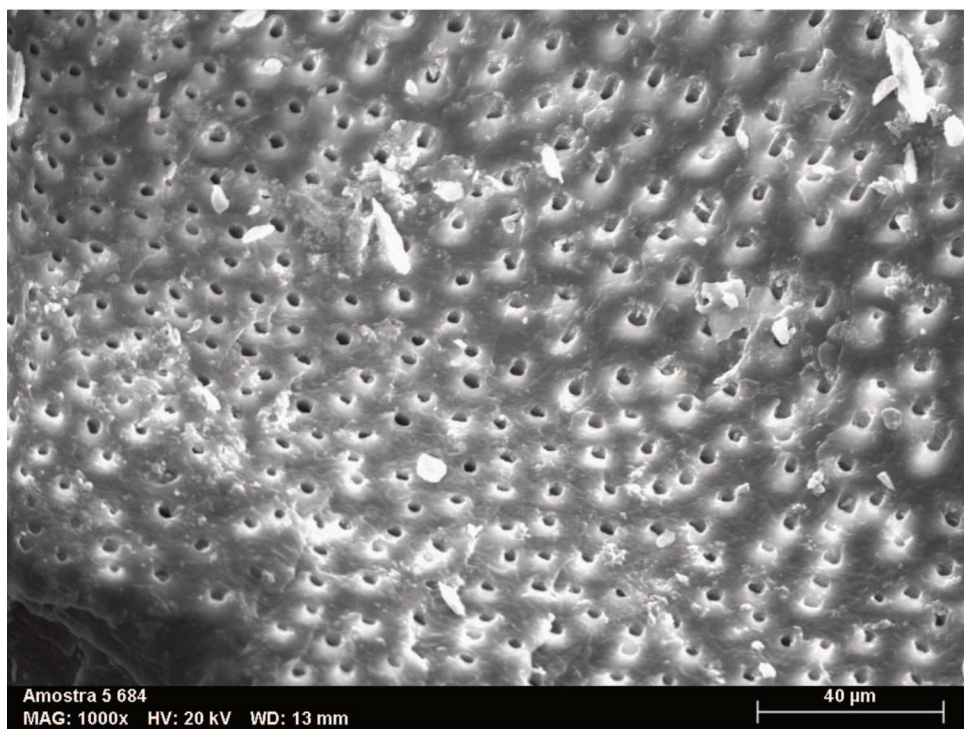
9. Uma das partículas de dentina do Grupo A, observada ao SEM (1000x)



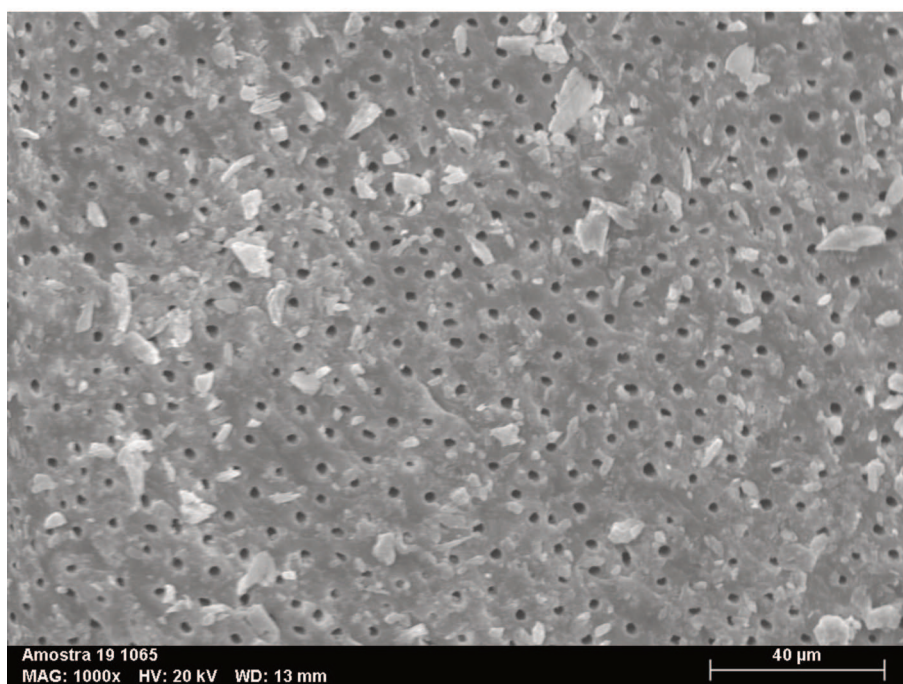
10. Uma das partículas de dentina do Grupo A, observada ao SEM (1000x)



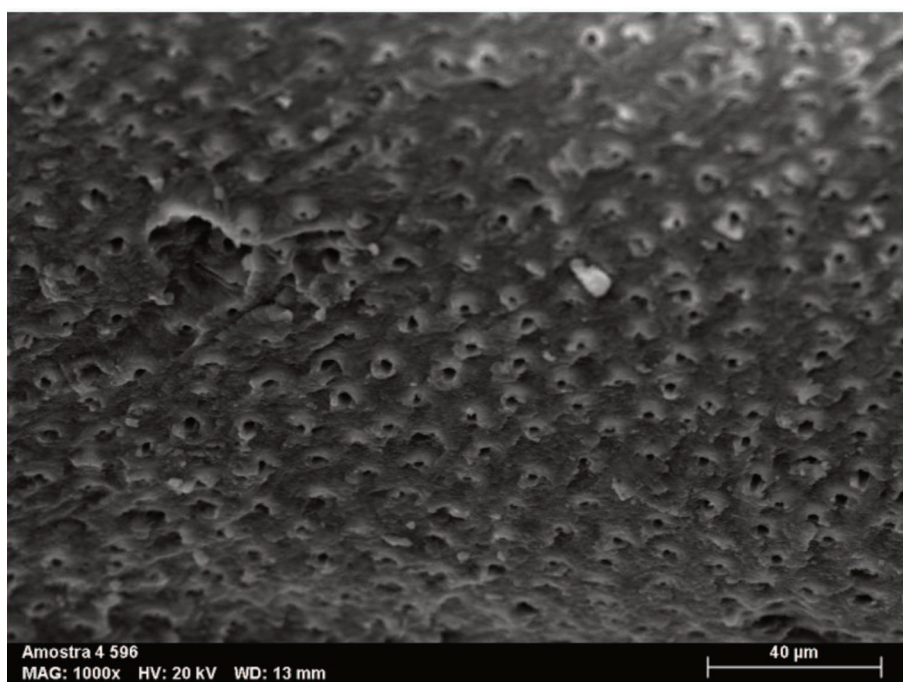
11. Uma das partículas do Grupo C, observada ao SEM (1000x)



12. Uma das partículas do Grupo C, observada ao SEM (1000x)



13. Uma das partículas do Grupo B, observada ao SEM (1000x)



14. Uma das partículas do Grupo B, observada ao SEM (1000x)

